

**MARCO AURÉLIO RAEDER DA COSTA**

**TERAPIA GÊNICA NA PROTEÇÃO DE ILHOTAS DE LANGERHANS  
UTILIZANDO SURVIVINA**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do Grau Acadêmico de Doutor em Clínica Cirúrgica.**

**Orientador: Prof. Dr. Júlio Cezar Uili Coelho  
Coordenador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto  
Matias**

**CURITIBA  
2005**

Costa, Marco Aurélio Raeder da  
Terapia gênica na proteção de ilhotas de Langerhans utilizando  
Survivina / Marco Aurélio Raeder da Costa. Curitiba, 2005.  
---f.119

Orientador: Júlio Cezar Uili Coelho

Dissertação (Doutorado) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade  
Federal do Paraná.

1. Transplante das Ilhotas de Langerhans. 2. Enxerto das Ilhotas de  
Langerhans. 3. Diabetes Mellitus. 4. Apoptose. 5. Terapia de genes. I. Título. II. Júlio  
Cezar Uili Coelho.




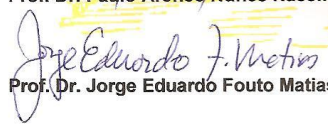
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA  
NÍVEL MESTRADO - DOUTORADO

Ata do julgamento da 92ª Tese de Doutorado 388ª do Curso para conclusão do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Nível Doutorado da Universidade Federal do Paraná, referente o aluno **MARCO AURÉLIO RAEDER DA COSTA**, com o título: **"TERAPIA GÊNICA NA PROTEÇÃO DE ILHOTAS DE LANGERHANS UTILIZANDO SURVIVINA"**, tendo como orientador Prof. Dr. Júlio Cezar Uilli Coelho.

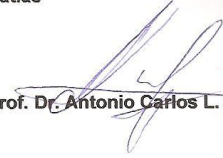
Às oito horas do dia cinco de dezembro de dois mil e cinco, no Auditório do 7º andar central do Hospital de Clínicas, teve início a prova em epígrafe, constituída a Comissão Examinadora pelos **Professores Doutores: Paulo Afonso Nunes Nassif, Alexandre Coutinho Teixeira de Freitas, Jorge Eduardo Fouto Matias, José Luiz de Godoy e Antonio Carlos L. Campos**, sendo este último **Presidente da Comissão**. Aberta a sessão foi apresentada pelo **Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias**, Coordenador do Programa, a documentação probatória do cumprimento pelo candidato das exigências legais que lhe facultam submeter-se à avaliação da tese, como última etapa à sua titulação no Programa. A seguir o Presidente da Comissão convidou o candidato a apresentar oralmente resumo de sua tese no prazo máximo de trinta minutos para demonstração de sua capacidade didática e para melhor conhecimento do tema por parte da audiência composta de professores, médicos, alunos, familiares e demais interessados. Seguiu-se a arguição e imediata resposta pelo candidato, sucessivamente pelos componentes da Comissão Examinadora. Obedecido o tempo máximo de vinte minutos para a arguição e igual tempo para cada resposta. Terminada a etapa de arguição, reuniu-se a Comissão Examinadora em sala reservada para atribuição das notas, dos conceitos e lavratura do Parecer Conjunto necessário. Os conceitos e notas atribuídos foram: **Prof. Dr. Paulo Afonso Nunes Nassif: conceito "A" e equivalência "10"**; **Prof. Dr. Alexandre Coutinho Teixeira de Freitas: conceito "A" e equivalência "10"**; **Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias: conceito "A" e equivalência "10"**; **Prof. Dr. José Luiz de Godoy: conceito "A" e equivalência "10"**; **Prof. Dr. Antonio Carlos L. Campos: conceito "A" e equivalência "10"**. Voltando à sala de sessão, o Senhor Presidente da Comissão leu os conceitos do Parecer Conjunto, dando como final o conceito "A" e equivalência "10", e a recomendação de que a tese com o título já referido, possa ser publicada na forma final nos meios de divulgação científica adequados, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições. E para que tudo conste, foi lavrada a presente Ata, que vai assinada pelos seguintes componentes da Comissão Examinadora.

  
Prof. Dr. Paulo Afonso Nunes Nassif

  
Prof. Dr. Alexandre Coutinho Teixeira de Freitas

  
Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

  
Prof. Dr. José Luiz de Godoy

  
Prof. Dr. Antonio Carlos L. Campos

Pouco conhecimento faz que as criaturas se sintam orgulhosas;  
muito conhecimento, que se sintam humildes.  
É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu,  
enquanto as cheias a baixam para a terra, sua mãe.

*Leonardo da Vinci*

Aos meus pais, pelo estímulo à educação e à formação profissional.

À minha esposa Sumaya, pelo apoio constante e pelo incentivo incondicional, sem os quais este trabalho não seria possível.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Júlio Cezar Uili Coelho, da Universidade Federal do Paraná, orientador deste trabalho, pelo estímulo constante à vida acadêmica, pela tutoração profissional e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Giacomo Piero Basadonna, da Universidade de Massachusetts, pela oportunidade oferecida para trabalhar em seu laboratório e por seu estímulo constante à pesquisa.

Ao Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias, coordenador do Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, pelo estímulo e pela valorização à vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Ligocki Campos, pelo exemplo acadêmico e profissional.

Ao Prof. Dr. Paolo Rogério Salvalaggio, pela amizade, pelos conselhos e pelo exemplo profissional.

À Charlotte E. Aryian, residente em cirurgia geral na Escola de Medicina de Yale, pela ajuda inicial nos experimentos envolvendo survivina.

Ao Dr. Aaron Bloomenthal, residente em cirurgia geral da Universidade de Massachusetts, pela amizade e pelo auxílio constante em parte dos experimentos.

Ao Dr. Sean Bradley, PhD do Departamento de Cirurgia da Universidade de Massachusetts, pela ajuda e pelos ensinamentos em biologia molecular.

A Takehiko Dohi, pós-doutorando do Departamento de Oncologia da Universidade de Massachusetts, juntamente com Dr. Sherwin de YALE, pelos ensinamentos relacionados com a proteína survivina e pelo fornecimento do *construct* que originou o complexo survivina-pAd-GFP e a linhagem transgênica NOD.

A David Pinkerton, assistente de dados do Laboratório de Transplante da Universidade de Massachusetts, pelos conselhos e pela ajuda na análise estatística dos dados contidos neste trabalho.

À Prof.<sup>a</sup> Izabel Mituco Akiyoshi Loureiro, professora de Língua Portuguesa, pela revisão do texto contido nesta tese.

A CAPES, pelo apoio e pela viabilização desta pesquisa.

## SUMÁRIO

	<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	x
	<b>LISTA DE GRÁFICOS.....</b>	xi
	<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....</b>	xii
	<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....</b>	xiv
	<b>RESUMO.....</b>	xvi
	<b>ABSTRACT.....</b>	xiii
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	2
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	8
2.1	<i>DIABETES MELLITUS</i> .....	8
2.1.1	Reposição de Células Beta como Terapia para Controle do Diabetes .....	11
2.2	<b>MECANISMOS DE MORTE CELULAR NAS CÉLULAS DAS ILHOTAS DE LANGERHANS</b> .....	15
2.3	<b>HOMEOSTASE E VIAS DE SINALIZAÇÃO DA MORTE CELULAR</b> .....	18
2.4	<b>TERAPIA GÊNICA NA PROTEÇÃO DE ILHOTAS DE LANGERHANS</b> .....	21
2.5	<b>AS PROTEÍNAS INIBIDORAS DA APOPTOSE (PIA)</b> .....	23
2.5.1	Modelos de Injúria Tecidual e Expressão de Pias .....	24
2.6	<b>A PROTEÍNA INIBIDORA DA APOPTOSE SURVIVINA</b> .....	25
2.6.1	Estrutura da Proteína Survivina .....	25
2.6.2	Survivina e Neovascularização.....	26
2.6.3	Survivina e Inibição da Apoptose.....	27
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
3.1	<b>ANIMAIS</b> .....	30
3.2	<b>ANESTESIA E MORTE DOS ANIMAIS</b> .....	31
3.3	<b>ISOLAMENTO DE ILHOTAS DE LANGERHANS</b> .....	31
3.3.1	Injeção de Colagenase e Pancreatectomia nos Doadores .....	31
3.3.2	Digestão do Tecido Exócrino do Pâncreas .....	33
3.3.3	Purificação das Ilhotas de Langerhans .....	34
3.3.4	Pureza e Viabilidade das Ilhotas de Langerhans .....	34
3.3.5	Contagem das Ilhotas de Langerhans .....	35
3.4	<b>PURIFICAÇÃO DO VETOR ADENOVIRAL</b> .....	36
3.4.1	Amplificação do vetor adenoviral .....	36
3.4.2	Coleta do vetor adenoviral.....	36
3.4.3	Purificação do vetor adenoviral.....	37
3.4.4	Titulação do vetor adenoviral .....	38
3.5	<b>TRANSDUÇÃO DE ILHOTAS COM OS VETORES VIRAIS</b> .....	41
3.5.1	Análise da Fluorescência das Ilhotas Transduzidas com os Vetores Virais.....	42
3.6	<b>WESTERN BLOT PARA DETECÇÃO DA PROTEÍNA SURVIVINA</b> .....	42
3.6.1	Lise das Ilhotas para Obtenção de Proteína.....	42
3.6.2	Ensaio de Bradford para Quantificação Protéica.....	43
3.6.3	Imunoblot.....	44
3.7	<b>AValiação Funcional das Ilhotas Isoladas</b> .....	45

3.8	AVALIAÇÃO DO ÍNDICE APOPTÓTICO POR MEIO DE COLORIMETRIA .....	46
3.9	TRANSPLANTE DE ILHOTAS DE LANGERHANS .....	48
3.9.1	Camundongos Submetidos a Transplante de Ilhotas de Langerhans .....	48
3.9.2	Indução de Diabetes Química.....	48
3.9.3	Preparo do Enxerto de Ilhotas de Langerhans .....	49
3.9.4	Transplante das Ilhotas de Langerhans no Receptor .....	50
3.9.5	Nefrectomia em Receptores dos Tranplantes de Ilhotas de Langerhans...	51
3.9.6	Cuidados Pós-operatórios .....	52
3.9.7	Avaliação da Glicemia no Pós-operatório .....	52
3.9.8	Avaliação do Peso em Camundongos NOD/ <i>scid</i> .....	53
3.10	ESTUDO DA INCIDÊNCIA DE DIABETES EM CAMUNDONGOS NOD.....	53
3.10.1	Construção de Camundongos NOD/LTJ Transgênicos para Survivina. ...	53
3.10.2	Protocolo de Cruzamento para Camundongos NOD/Ltj “wild type-WT” e Camundongos NOD/LTJ Tgn-Survivina. ....	53
3.10.3	Isolamento de DNA Total das Progênes de Camundongos NOD/LTJ Tgn para Survivina .....	54
3.10.4	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para Identificação de Camundongos NOD/Ltj Transgênicos para Survivina.....	55
3.10.5	Controle da Incidência de Diabetes em Camundongos NOD/LTJ.....	57
3.11	HISTOLOGIA .....	57
3.11.1	Imunoistoquímica para Detecção de Survivina.....	57
3.11.2	Imunofluorescência Indireta para Detecção de Survivina.....	58
3.11.3	Avaliação de Apoptose Mediante Coloração Específica para Núcleos Celulares .....	59
3.11.4	Estudo Histológico com Coloração de Hematoxilina-Eosina em Pâncreas de Camundongos NOD Ltj e NOD Tgn para Survivina. ....	60
3.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
4	<b>RESULTADOS</b> .....	62
4.1	TRANSDUÇÃO DE ILHOTAS DE LANGERHANS COM PAD-GFP-SURVIVINA .....	62
4.2	TESTE <i>WESTERN BLOT</i> PARA DETECÇÃO DA PROTEÍNA SURVIVINA .....	64
4.3	IMMUNOISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE SURVIVINA EM ILHOTAS ISOLADAS .....	65
4.4	AVALIAÇÃO FUNCIONAL DAS ILHOTAS <i>in vitro</i> POR MEIO DE RADIOIMUNOENSAIO .....	66
4.5	ÍNDICE APOPTÓTICO DE ILHOTAS AVALIADO MEDIANTE COLORIMETRIA .....	67
4.6	COLORAÇÃO DE DAPI PARA ANÁLISE DE APOPTOSE MEDIANTE MORFOLOGIA NUCLEAR.....	69
4.7	TRANSPLANTE DE ILHOTAS .....	70
4.7.1	Transplante de Ilhotas Marginal Singênico .....	70



4.7.1.2	Imunoistoquímica para detecção de survivina em enxertos marginais singênicos .....	71
4.7.2	Transplante de Ilhotas Ideal Alogênico .....	73
4.7.3	Acompanhamento do Peso Peritransplante nos Receptores de Enxerto Ideal Nod/Scid .....	74
4.8	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	75
4.9	IMUNOISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE SURVIVINA EM PÂNCREAS DE CAMUNDONGOS NOD TRANSGÊNICOS PARA SURVIVINA .....	76
4.10	ANÁLISE DE INSULITE EM CAMUNDONGOS NOD/LTJ FÊMEAS TRANSGÊNICOS PARA SURVIVINA E TIPO SELVAGEM (WT)....	77
4.11	INCIDÊNCIA DE DIABETES EM CAMUNDONGOS NOD/LTJ FÊMEAS TRANSGÊNICOS PARA SURVIVINA E EM CAMUNDONGOS NOD/LTJ FÊMEAS TIPO SELVAGEM (WT) .....	79
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	81
5.1	O MODELO ANIMAL: .....	81
5.1.1	Transplante de Ilhotas em Camundongos.....	81
5.1.2	Camundongos Nod como Modelo de Diabetes Auto-Imune .....	83
5.2	O VETOR ADENOVIRAL.....	84
5.3	EXPRESSÃO DE SURVIVINA EM ILHOTAS DE LANGERHANS ...	85
5.4	PADRÃO DE SECREÇÃO DE INSULINA EM ILHOTAS EXPRESSANDO SURVIVINA E GFP .....	87
5.5	EFEITO PROTETOR DA SURVIVINA CONTRA APOPTOSE .....	88
5.6	INCIDÊNCIA DO DIABETES EM CAMUNDONGOS NOD/LTJ COM EXPRESSÃO TRANSGÊNICA DE SURVIVINA NAS ILHOTAS DE LANGERHANS.....	93
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	98
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	100
	<b>ANEXOS</b> .....	116

## LISTA DE TABELAS

1.	DILUIÇÕES SERIADAS EM LOG DE 10 DA SOLUÇÃO ESTOQUE VIRAL PURIFICADA.....	39
2.	CURVA PADRÃO DE REFERÊNCIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS DE PROTEÍNA .....	44
3.	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DOS GRUPOS QUE RECEBERAM ENXERTO DE ILHOTAS DE LANGERHANS.....	49
4.	COMPONENTES DE CADA AMOSTRA DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA POR PCR.....	56
5.	CONDIÇÕES OTIMIZADAS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA AMPLIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE BASES CORRESPONDENTES AO GENE SURVIVINA .....	56
6.	PESO E VALORES DE GLICOSE SÉRICA EM CAMUNDONGOS NOD/ <i>SCID</i> DIABÉTICOS, RECEPTORES DE ENXERTO ALOGÊNICO IDEAL DE ILHOTAS .....	75

## LISTA DE GRÁFICOS

1.	PADRÃO SECRETÓRIO DE INSULINA EM ILHOTAS TRANSDUZIDAS COM SURVIVINA	67
2.	PROTEÇÃO ANTIAPÓPTÓTICA OFERECIDA POR SURVIVINA APÓS INSULTO CITOTÓXICO	68
3.	EVOLUÇÃO DA GLICOSE SÉRICA EM RECIPIENTES DE ENXERTOS MARGINAIS SINGÊNICOS DE ILHOTAS	71
4.	GRÁFICO DE KAPLAN MEIER ILUSTRANDO A SOBREVIDA DOS ENXERTOS DE ILHOTAS EM MODELO DE TRANSPLANTE ALOGÊNICO IDEAL.	74
5.	INCIDÊNCIA DE DM EM CAMUNDONGOS NOD TRANSGÊNICOS PARA SURVIVINA E CONTROLES TIPO SELVAGEM (WT)	79

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1. DIAGRAMA ILUSTRATIVO DAS VIAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE APOPTOSE CELULAR	20
2. INJEÇÃO INTRAPANCREÁTICA DE COLAGENASE. CANULAÇÃO DO DUCTO HEPÁTICO COMUM PARA INJEÇÃO DE COLAGENASE NO PÂNCREAS COM CLAMPEAMENTO PRÉVIO DA PÁPIA NA SEGUNDA PORÇÃO DO DUODENO.	32
3. ASPECTO DE TRÊS UNIDADES DE PÂNCREAS DISTENDIDOS MEDIANTE INJEÇÃO DE COLAGENASE EM PLACA DE PETRI	33
4. ASPECTO FINAL DE UMA AMOSTRA DE ILHOTAS DE LANGERHANS CORADAS POR DITIZONA APÓS A PURIFICAÇÃO. 200x	35
5. TITULAÇÃO VIRAL APÓS PURIFICAÇÃO DO ADENOVÍRUS. DIAGRAMA REPRESENTATIVO DAS SOLUÇÕES VIRAIS DILUÍDAS, DISTRIBUÍDAS EM DUPLICATA, NA PLACA DE CULTURA CONTENDO 5X10 <sup>5</sup> CÉLULAS 293-HEK.	39
6. ASPECTO DE DILUIÇÃO IDEAL PARA CONTAGEM DE CÉLULAS POSITIVAS (COLORAÇÃO MARROM-NEGRA) E TITULAÇÃO VIRAL. RESULTADO DE UMA DAS PURIFICAÇÕES VIRAIS DE PAD-SURVIVINA.	41
7. ALOCAÇÃO DAS ILHOTAS DE ACORDO COM OS GRUPOS DE TRATAMENTO NUMA PLACA DE 96 RESERVATÓRIOS. NÚMERO TOTAL DE ILHOTAS POR GRUPO: 300; 50 POR RESERVATÓRIO; 150 COM ADIÇÃO DE CITOQUINAS(+) E 150 SEM(-).	47
8. ASPECTO DE UM ENXERTO IDEAL DE 400 ILHOTAS DE LANGERHANS APÓS INJEÇÃO NA LOJA SUBCAPSULAR RENAL ESQUERDA	51
9. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA FLUORESCENTE VERDE (GFP) EM ILHOTAS DE LANGERHANS	62
10. IMAGEM DE CÉLULAS DISSOCIADAS DE ILHOTAS TRANSDUZIDAS COM PAD-SURVIVINA-GFP APÓS CITOCENTRIFUGAÇÃO	63
11. TESTE <i>WESTERN BLOT</i> EM LISADO DE ILHOTAS PARA DETECÇÃO DA PROTEÍNA SURVIVINA	65

12. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA SURVIVINA POR IMUNOISTOQUÍMICA	66
13. PROTEÇÃO OFERECIDA PELA TRANSDUÇÃO DE SURVIVINA EM ILHOTAS SUBMETIDAS A INSULTO HIPÓXICO E À PRIVAÇÃO DE NUTRIENTES	69
14. MACROSCOPIA DE UM ENXERTO MARGINAL SINGÊNICO FUNCIONANTE DE ILHOTAS NO ESPAÇO SUBCAPSULAR RENAL	72
15. IMUNOISTOQUÍMICA EM ENXERTOS MARGINAIS DE ILHOTAS TRANSPLANTADOS SOB A CÁPSULA RENAL	73
16. BANDAS POSITIVAS PARA SURVIVINA EM GEL DE AGAROSE	76
17. IMUNOISTOQUÍMICA EM TECIDO PANCREÁTICO DE CAMUNDONGOS NOD TRANSGÊNICOS PARA SURVIVINA E CONTROLES DO TIPO SELVAGEM (WT)	77
18. PROCESSO DE INSULITE EM CAMUNDONGOS NOD TRANSGÊNICOS PARA SURVIVINA E CONTROLES DO TIPO SELVAGEM (WT)	78
19. ARQUITETURA DE UMA ILHOTA DE LANGERHANS	87
20. VIAS APOPTÓTICAS E SURVIVINA	92

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABS	- Albumina sérica bovina
ANOVA	- Análise de múltipla variância
ATP	- Adenosine trifosfato
ATCC	- American type tissue collection (órgão Americano que regulamente a venda de linhas celulares)
bp	- Pares de bases
°C	- Grau Celsius
CE	- Células endoteliais
CH	- Carboidrato
cm	- Centímetro
cm <sup>2</sup>	- Centímetro quadrado
CO <sub>2</sub>	- Dióxido de carbono
cols.	- Colaboradores
CSM	- Complexo de sinalização de morte
DAB	- Diamino benzidina
DAPI	- 4',6'-Diamidino-2- fenilindol, dihidroclorato
DCCT	- Estudo de controle e de complicações do diabetes
dl	- Decilitro
DM	- <i>Diabetes mellitus</i>
DMID	- <i>Diabetes mellitus</i> insulino dependente
DMSO	- Sulfóxido de dimetila
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
EDTA	- Ácido etileno diamino tetracético
EI	- Equivalente de ilhotas
et al	- E colaboradores
FCEV	- Fator de crescimento do endotélio vascular
FCF	- Fator de crescimento de fibroblastos
FIA	- Fator de indução de apoptose
FNT- $\alpha$	- Fator de necrose tumoral <i>alpha</i>
g	- Gravidade
G	- Gauge
GFP	- Proteína fluorescente verde
Hg	- Mercúrio
H&E	- Hematoxilina e eosina
HEK	- Células embrionárias renais humanas
IACUC	- Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais
IFN- $\gamma$	- Interferon- <i>gamma</i>
IL-1 $\beta$	- Interleuquina-1- <i>beta</i>
IPTR	- Registro Internacional de Transplante de Pâncreas
K	- Potássio
kb	- quilobase
kDa	- quilodalton
kg	- quilograma

mg	- Miligrama
MHC	- Complexo maior de histocompatibilidade
min	- Minuto
ml	- Mililitro
mm	- Milímetro
mm <sup>2</sup>	- Milímetro quadrado
MTT	- Dimetiltiazol-2,5-brometo difenil de tetrazólio
n	- Tamanho da amostra
NAIP	- Proteína inibidora de apoptose neuronal
ng	- Nanograma
nm	- Nanômetro
nM	- Nanomolar
NOD	- Camundongo diabético não-obeso
NTgn	- Não-transgênico
p	- Página
pAd	- Vetor de adenovírus
PaO <sub>2</sub>	- Pressão parcial de oxigênio
PBS	- Solução tamponada de fosfato
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PIA	- Proteína inibidora da apoptose
q	- Braço curto de cromossomo
RNA <sub>m</sub>	- Ácido ribonucléico mensageiro
rpm	- Rotações por minuto
<i>scid</i>	- Imunodeficiência intensa combinada
siRNA	- Ácido ribonucleico de pequena interferência
TAE	- Tampão de eletroforese
TGF-β	- Fator de crescimento tumoral <i>beta</i>
Tgn	- Transgênico
TNF-R	- Receptor de fator de necrose tumoral
U	- Unidade
UFI	- Unidades formadoras de infecção
UV	- Ultravioleta
V	- Volts
WT	- Tipo selvagem
XIAP	- Proteína inibidora de apoptose ligada ao cromossomo X
μg	- Micrograma
μl	- Microlitro
μm	- Micrômetro
μM	- Micromolar

# TERAPIA GÊNICA NA PROTEÇÃO DE ILHOTAS DE LANGERHANS UTILIZANDO SURVIVINA

## RESUMO

Este estudo avaliou o efeito da survivina, uma das proteínas inibidoras da apoptose (PIAs), no prolongamento da sobrevivência e na diminuição de apoptose de ilhotas de Langerhans *in vitro* e *in vivo*. Transduziram-se ilhotas isoladas de camundongos Balb/c durante um período de doze horas com o gene survivina utilizando-se um adenovírus defectivo como vetor viral (pAd) associado à proteína verde fluorescente (GFP). Avaliou-se a expressão ideal da survivina com *imunoblot* e fluorescência direta, submetendo-se, além disso, ilhotas transduzidas à imunoistoquímica para avaliação da penetração do vetor viral e da survivina na estrutura insular. Submeteram-se a teste de secreção de insulina por radioimunoensaio ilhotas com adequada expressão de survivina para se avaliarem os possíveis efeitos dessa proteína na função insular. Analisou-se a incidência de apoptose em ilhotas por estímulo citotóxico, mediante adição de citoquinas, e método de colorimetria. Apoptose foi também mensurada utilizando-se análise histológica de morfologia nuclear recorrendo-se a coloração nuclear específica DAPI em ilhotas transduzidas e submetidas à hipóxia e à privação de nutrientes. No modelo *in vivo*, efetuaram-se transplantes singênicos, contendo quantidade marginal de ilhotas transduzidas com o gene survivina, em camundongos C57Bl/6 quimicamente diabéticos. Transplantes de ilhotas alogênicos com massa ideal, transduzidos com survivina e provenientes de camundongos Balb/c foram efetuados em camundongos C57Bl/6 e NOD/Scid quimicamente diabéticos na ausência de imunossupressão. Ilhotas não transduzidas ou contendo apenas vetor viral e GFP serviram como controle. Criou-se um camundongo NOD/Ltj transgênico para survivina com expressão aumentada dessa proteína nas ilhotas pancreáticas e estudou-se a incidência de diabetes em comparação ao grupo do tipo selvagem, que desenvolve diabetes do tipo autoimune em 100% das fêmeas na idade de 25 semanas. A dose de pAd-survivina-GFP com boa expressão da proteína, evidenciada tanto por *imunoblot* como por fluorescência, que não afetou a função de ilhotas isoladas foi de  $2.5 \times 10^7$  unidades formadoras de infecção (UFI), utilizada nas etapas posteriores deste estudo. A expressão de survivina associou-se à diminuição do índice apoptótico em ilhotas submetidas a estresse citotóxico (5.9%-pAd-survivina-GFP vs. 44%-pAd-GFP e 50%-controle,  $p < 0.05$ ). A presença de survivina em ilhotas expostas à hipóxia e à privação de nutrientes revelou um índice de morte celular programada três vezes menor quando comparada à morte celular de ilhotas transduzidas com pAd-GFP (21.2%-survivina vs 62.8%-GFP,  $p < 0.05$ ). Camundongos diabéticos receptores de enxertos singênicos marginal de ilhotas transduzidos com survivina apresentaram taxa de glicemia sérica semelhante à verificada em animais não diabéticos, enquanto receptores de enxertos marginais sem tratamento ou transduzidos com GFP apenas permaneceram hiperglicêmicos. Camundongos C57bl/6 receptores de massa ideal de ilhotas alogênicas transduzida com survivina apresentaram aumento significativo na sobrevivência do enxerto quando comparado aos grupos controle ( $p < 0.002$ ). Obteve-se em camundongos NOD/Ltj, com sucesso, a expressão transgênica de survivina, associada



a um retardamento significativo no desenvolvimento de insulite e de diabetes autoimune. Conclui-se que a survivina atenua o processo de morte celular programada desencadeado por estímulos citotóxicos, isquêmicos e imunológicos em ilhotas de Langerhans, tanto *in vitro* como *in vivo*, representando uma alternativa atraente na terapia gênica para tratamento do diabetes.

Palavras-chave: Transplante de Ilhotas de Langerhans, Enxerto de Ilhotas de Langerhans, *Diabetes Mellitus*, Apoptose, Terapia de Genes.

# GENE THERAPY WITH SURVIVIN TO PROTECT ISLETS OF LANGERHANS

## ABSTRACT

This study has evaluated survivin, one of the inhibitor of apoptosis proteins (IAPs), in prolonging survival and decreasing apoptosis in islets of Langerhans both *in vitro* and *in vivo*. Isolated Balb/c islets were transduced with survivin over 12 hours using an adenoviral vector associated with green fluorescent protein (GFP). Ideal expression of survivin was evaluated through immunoblot and direct fluorescence. In addition, transduced islets were analyzed by immunohistochemistry for survivin gene penetration throughout the islet structure. Islets expressing survivin were submitted to quantitative radioimmunoassay for insulin secretion to evaluate islet functionality. *In vitro* cytotoxic induced apoptosis, by addition of cytokines, was analyzed by colorimetric assay. Apoptosis was also measured through nuclear morphology using nuclear-specific DAPI staining in transduced islets submitted to hypoxia and nutrient deprivation. *In vivo*, syngeneic marginal transduced islets grafts were performed in chemically diabetic C57Bl/6 mice. Allogeneic full mass transduced islets grafts from Balb/c were transplanted into chemically diabetic C57Bl/6 and NOD/Scid mice. Islets either non-transduced or transduced with the adenoviral vector and GFP were used as controls in all experiments. Finally, a transgenic NOD/Ltj mouse overexpressing survivin in islets was generated and used for diabetes incidence studies compared to the wild type, which develops autoimmune diabetes in 100% of females by 25 weeks of age. The pAd-survivin-GFP dose showing good protein expression, evidenced by immunoblot and fluorescence, with no islet functional impairment, was  $2.5 \times 10^7$  infections forming units (IFU), being the dose utilized in further experiments. Survivin expression was associated with decreased apoptotic index in islets submitted to cytokine-induced stress (5.9%-pAd-survivin-GFP vs. 44%-pAd-GFP e 50%-control,  $p < 0.05$ ). Survivin presence in islets exposed to hypoxia and nutrient deprivation was responsible for a three-fold decrease in cell death index when compared to pAd-GFP transduced islets (21.2%-survivin vs. 62.8%-GFP,  $p < 0.05$ ). Diabetic mice recipients of a syngeneic marginal survivin-transduced graft showed glucose with a trend to normoglycemia, while recipients of non-transduced or GFP-transduced remained in hyperglycemia. C57Bl/6 mice receiving an ideal allogeneic graft showed a significant prolonged graft survival compared to control groups ( $p < 0.002$ ). Successful transgenic survivin expression in NOD/Ltj mice was associated to a delay in the development of insulinitis and autoimmune diabetes. In conclusion survivin decreases the programmed cell death process which occurs upon cytotoxic, ischemic and immunologic stimuli in islets of Langerhans, both *in vitro* and *in vivo*, representing a promising alternative in gene therapy for diabetes treatment.

Key-words: Islet Transplantation, Islet Graft, *Diabetes Mellitus*, Apoptosis, Gene Therapy.



## 1 INTRODUÇÃO

Na virada do século, a um paciente com diagnóstico de *diabetes mellitus* tipo I previa-se uma expectativa de vida de apenas dois anos. O desenvolvimento da insulina como agente terapêutico revolucionou o tratamento do diabetes transformando a entidade fatal em doença crônica. Infelizmente, esse prolongamento da longevidade trouxe consigo severas e devastantes complicações secundárias do diabetes, incluindo nefropatia, neuropatia, retinopatia e acometimento micro/macro vascular, males que se instalam em lapso de tempo de dez a vinte anos após o diagnóstico inicial da doença.

A incidência de diabetes tipo I acusa inquietante ascensão nos EUA, país em que se constata a existência de, pelo menos, um milhão de indivíduos acometidos pela doença e em que, anualmente, diagnosticam-se 30.000 novos casos aproximadamente (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH- Diabetes in America, 1995). Complicações associadas à doença que concorrem para o aumento do risco de vida (PORTUESE; ORCHARD, 1995) são preveníveis utilizando-se um esquema de insulinoterapia rígida, de acordo com as etapas do famoso Estudo Clínico de Controle e Complicações do Diabetes-EDIC (1999 e 2002). Entretanto, mesmo com o desenvolvimento de novas técnicas de monitoramento de níveis glicêmicos e de dispositivos precisos de administração de insulina, a manutenção da euglicemia em portadores de diabetes tipo I é muito difícil e complicada, em razão dos freqüentes episódios de hipoglicemia intensa. A única terapêutica que, comprovadamente, atenua e/ou estabiliza as complicações secundárias do diabetes e mantém os níveis glicêmicos estáveis reside na reposição de células beta por transplante, seja de pâncreas, seja de ilhotas pancreáticas.

No transplante de pâncreas, o órgão provê uma massa de ilhotas suficiente para obtenção de insulinoindpendência no recipiente. Todavia, considere-se que os índices de morbidade registrados em decorrência desse procedimento denunciam proporções encontráveis em procedimentos cirúrgicos de grande porte, principalmente quando realizada em pacientes portadores doença cardiovascular avançada. Além disso, implanta-se o pâncreas em posição intra-abdominal, com a secreção exócrina

drenada pela bexiga ou intestino delgado, técnicas que expõem o paciente a risco de obstrução intestinal, infecções do trato urinário de repetição e distúrbios metabólicos.

Os primeiros transplantes de ilhotas bem-sucedidos, realizados em roedores no início dos anos 70 (YOUNOSZAI; SORENSON; LINDALL, 1970; BALLINGER; LACY, 1972; RECKARD; ZIEGLER; BARKER, 1973; PANIJAYANOND; SOROFF; MONACO, 1973), alimentaram a expectativa de que tal terapia estaria disponível em um curto período de tempo a pacientes portadores do diabetes tipo I. O transplante de ilhotas pancreáticas tem a capacidade de oferecer as células necessárias à cura do diabetes, poupando o paciente de ser submetido a um grande procedimento cirúrgico (SUTHERLAND; MATAS; NAJARIAN, 1978; SUTHERLAND, 1981; SUTHERLAND, 1996). No início do século 21, a incapacidade de se confirmar tal teoria frustrou as expectativas de pacientes, de familiares, de clínicos e de pesquisadores. A explicação mais simples para a demora na solução dos problemas envolvidos no transplante de ilhotas é a de que, apesar da simplicidade do conceito, o procedimento se mostrou extremamente difícil. Existem ainda duas grandes barreiras a serem vencidas para o sucesso do transplante de ilhotas pancreáticas: 1) o número de ilhotas isoladas de um órgão que geralmente não proporciona massa de células *beta* suficiente para a maioria dos recipientes atingir normoglicemia; 2) a perda precoce da massa de ilhotas transplantada que ocorre por: injúria durante o isolamento e purificação, rejeição e destruição autoimune do enxerto.

As causas da perda da massa funcionante no período peritransplante incluem: lesão provocada pelas enzimas utilizadas na digestão e pelo gradiente Ficoll (purificação) gerando ativação do complemento (JAHR et al., 1995), ruptura das interações da matriz extracelular (THOMAS et al., 1999; THOMAS et al., 2001), além de privação de oxigênio e de nutrientes em um enxerto não vascularizado (CARLSSON et al., 1998), e ainda, aumento da expressão de proteínas apoptóticas como BAX (THOMAS et al., 2002) sem contar a injúria do enxerto por citocinas, principalmente Interleucina-1 $\beta$ , Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  e Interferon- $\gamma$  (DELANEY et al., 1997; MAEDLER et al., 2002). Não fossem suficientes tais complicações, instala-se a perspectiva de destruição do enxerto pelo caráter

recidivante e autoimune do diabetes tipo I, também por via inflamatória mediada por células T de memória.

A possibilidade de se introduzirem genes funcionais em tecidos ou em células progenitoras (THOMAS; EHRHARDT; KAY, 2003) vislumbra opções terapêuticas para diversas doenças crônicas, incluindo afecções cardiovasculares (MELO et al., 2004), defeitos congênitos (PERSONS; TISDALE, 2004), doenças autoimunes (CHERNAJOVSKY; GOULD; PODHAJCER, 2004) e câncer (MOON; OH; ROTH, 2003). A terapia gênica também desempenha função importante no campo de transplante de órgãos (GUILLOT et al., 2000), melhorando a sobrevivência do enxerto e eliminando a necessidade de imunossupressão sistêmica (BAGLEY; IACOMINI, 2003). Recentemente, o primeiro exemplo dessa terapêutica aplicada ao transplante teve como objetivo principal a engenharia genética de células *beta* (HARLAN; 2004) com o intuito de aperfeiçoar os resultados do implante de ilhotas para cura do diabetes tipo I (RICORDI; STROM, 2004; ROBERTSON, 2004). A expressão de “genes protetores” em ilhotas pancreáticas que ofereçam resistência à apoptose ou que favoreçam à neovascularização tem sido postulada como tática na redução da massa de células *beta* necessária à correção de insulinodependência, atenuando desta maneira o problema da indisponibilidade de órgãos pancreáticos transplantáveis que ocorre mundialmente (ROTHER e HARLAN, 2004). Entretanto, alguns pontos críticos precisam ser definidos antes de se considerar a contribuição da engenharia genética em ilhotas viável na prática clínica.

A survivina destaca-se como uma das proteínas inibidoras da apoptose que não é expressa em tecidos adultos diferenciados. Apesar de descoberta recentemente, essa proteína tem atraído atenção por suas características de citoproteção, divisão celular e diferenciação no campo da oncologia (ALTIERI, 2003), mas seus efeitos potenciais em células normais não foram ainda bem definidos. No presente estudo foram desenvolvidos alguns modelos animais de expressão aumentada da proteína survivina em células *beta* com o intuito de definir seu papel na proteção das ilhotas pancreáticas.

## OBJETIVOS

### Os objetivos deste estudo são:

- 1) verificar a expressão do gene survivina em ilhotas de Langerhans isoladas de camundongos e transduzidas com o vetor viral e survivina;
- 2) analisar o efeito da transdução viral e do gene survivina na secreção de insulina *in vitro* pelas células *beta* de ilhotas isoladas de camundongos;
- 3) analisar a incidência de apoptose *in vitro* em células *beta* de ilhotas de Langerhans isoladas de camundongos e transduzidas com o gene survivina;
- 4) analisar os efeitos da expressão do gene survivina *in vivo*:
  - a) em um modelo de transplante singênico com massa subótima de ilhotas de Langerhans em camundongos portadores de diabetes quimicamente induzido;
  - b) em um modelo de transplante alogênico com massa ideal de ilhotas de Langerhans em camundongos portadores de diabetes quimicamente induzido na ausência de imunossupressão;
  - c) em um modelo de transplante alogênico com massa ideal de ilhotas de Langerhans em camundongos com imunodeficiência intensa combinada (*scid*) portadores de diabetes quimicamente induzido;
- 5) analisar os efeitos do gene survivina na proteção contra destruição autoimune das ilhotas de Langerhans num modelo animal de diabetes tipo I.







## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *DIABETES MELLITUS*

A primeira evidência de uma descrição dos sintomas do diabetes documentada na literatura mundial encontra-se no relato que o papiro de Ebers registra e que data, aproximadamente, de 1500 a.C. Tal documento liga a descrição de poliúria a Imhotep, um estudioso da medicina, da arquitetura e da mágica, que se destacou como graduado sacerdote no reino do faraó Zosser por volta do ano 3000 a.C. (SHAFRIR, 1999). Somente três milênios mais tarde, dois médicos gregos na Roma antiga, GALENO (130-201 d.C.) e ARATEUS da Capadócia, descrevem a doença mais detalhadamente. Nos poucos fragmentos que restaram de um manuscrito de autoria de ARATEUS: *Doenças Crônicas e Agudas*; identifica-se o conjunto de sinais e de sintomas da doença como *siphon*, com o intuito de explicar a ‘liquefação da carne e ossos em urina’ (PORTER, 1997).

Em 1674, WILLIS, médico, anatomista e professor de fisiologia em Oxford, estabelece relação entre o paladar e a urina ‘doce’ de indivíduos diabéticos. Na verdade, o trabalho de WILLIS representa mais uma passo na contribuição investigativa a respeito do diabetes e não se impõe exatamente como trabalho inédito, uma vez que um documento hindu, escrito por SUSRUTA, em 400 a.C., já continha uma definição da síndrome diabética caracterizada por uma ‘urina com sabor de mel’ (SHADEWALDT, 1987). Willis, embora tenha mostrado empenho para identificar, entre as diversas substâncias químicas doces ao paladar, a substância responsável pelo gosto adocicado da urina, não logra atingir os resultados a que se propôs. Apenas um século mais tarde, em 1776, revela-se, em demonstração de DOBSON, que pacientes diabéticos excretam açúcar na urina. Após evaporação completa da urina, por ebulição, o pesquisador nota que o resíduo, um material cristalino, possui aparência e gosto de ‘açúcar mascavo’.

As conclusões de DOBSON logo despertam o interesse de estudiosos da época a respeito não apenas das possíveis causas da doença, mas também dos órgãos

provavelmente envolvidos. CAWLEY (1788) em um relato de caso, fornece descrição detalhada *post-mortem* de um pâncreas endurecido, diminuto, com cálculos em seu interior, proveniente de um paciente diabético. Impõe-se este relato como a primeira correlação que se estabelece entre o pâncreas e o diabetes humano presente em literatura, mas nenhuma conclusão se define com relação à etiologia do diabetes.

ROLLO (1797), em estudo quantitativo metabólico, não somente inaugura o conceito de glicosúria desenvolvido por Dobson, mas também define a primeira linha terapêutica do diabetes: a dietética, bem como relaciona a etiologia da doença com uma disfunção do aparelho gastrointestinal e não do aparelho urinário, como se supunha. Seu estudo consistiu em correlacionar tipos e quantidades de alimentos ingeridos por um paciente diabético com a quantidade de glicose recuperada de toda urina diária mediante ebulição. Tais observações revelaram um aumento de resíduo urinário com a ingestão de alimentos ricos em carboidratos (CH) e menos glicose com alimentos de origem animal. Para o investigador, o estômago identificava-se como o órgão responsável pela enfermidade ao produzir glicose em demasia, como consequência do consumo de frutas, de pão e de grãos. O tratamento preconizado foi, então, dieta pobre em carboidratos e rica em gordura e proteínas; terapia que persistiu como única disponível até o advento da insulina.

Apesar das conjecturas formuladas por ROLLO a respeito da possibilidade de os níveis de glicose no sangue de diabéticos mostrarem-se elevados, apenas a partir de 1914 métodos laboratoriais específicos de dosagem glicêmica no soro e na urina comprovam tal hipótese (EPSTEIN, 1914; BENEDICT, 1908; FOLIN, 1919).

Mesmo diante do ceticismo da sociedade médica com a relação que se estabeleceu entre o diabetes e o pâncreas, BERNARD (1850) realizou experimentos de ligadura do ducto pancreático em cães e/ou injeção intra-ductal de óleo ou de parafina com o objetivo de atingir o bloqueio total das secreções; técnicas que produziram grave atrofia da glândula. A hipótese aventada pelo autor de que os animais desenvolveriam diabetes não foi confirmada, uma vez que nenhum dos cães desenvolveu glicosúria ou qualquer outro sinal da doença. Mais uma vez a hipótese pancreática foi excluída pelos fisiologistas da época.

BOUCHARDAT, 1875 e LANCEREAUX, 1880, trabalhando em diferentes grupos, utilizaram a terapêutica descrita previamente por ROLLO, introduzindo uma modificação no tratamento de pacientes diabéticos: associaram a dieta pobre em CH a exercícios físicos vigorosos. Com isso, os autores observaram melhora significativa nos valores de glicosúria e de hiperglicemia. A experiência clínica obtida levou à primeira classificação do diabetes. Os autores definiram dois grupos de pacientes: pacientes jovens com doença grave que não respondiam bem ao regime terapêutico postulado (*diabète maigre*) e pacientes de idade mais avançada e obesos que apresentaram resultados sensacionais no controle do diabetes (*diabète gras*).

A conclusão do envolvimento do pâncreas na etiologia do diabetes materializou-se nos experimentos de VON MERING e MINKOWSKI, 1889. Os autores, ao realizarem pancreatectomia total em dois cães para estudo da digestão e da absorção de gorduras pelo pâncreas, notaram inesperadamente, que em menos de 24 horas os animais apresentaram significativo aumento da frequência e do débito urinários. A experiência clínica de MINKOWSKI em relação ao tratamento do diabetes humano induziu-o a dosar a glicose urinária dos cães, que indicou níveis extremamente elevados. Nos dois anos subsequentes, MINKOWSKI, 1889, demonstrou cabalmente que o pâncreas identificava-se como um órgão de secreção exócrina e endócrina e que uma pequena porção da glândula, implantada no tecido subcutâneo de um cão recentemente pancreatectomizado, prevenia o estabelecimento do estado de hiperglicemia até ressecção ou degeneração espontânea do enxerto.

Com a colaboração de vários pesquisadores e anos de estudos para a caracterização do mecanismo de produção, armazenamento, excreção e estrutura do hormônio pancreático (LAGUESSE, 1894; OPIE, 1900; STARLING, 1905; DE MEYER, 1909; PAULESCO, 1921), o isolamento da insulina, inicialmente denominada *isletin*, chega a lume com a contribuição de BANTING, MACLEOD, BEST e COLLIP. O trabalho foi agraciado com o Prêmio Nobel de Medicina do ano de 1923, consagrando os dois primeiros autores (LEVINE, R.; KRALL, L.; BARNETT, 1994). A substância corrigiu a acidose metabólica em um menino de 14 anos, mas revelou-se insuficiente em quantidade para suprir as necessidades do

organismo desse paciente. Subseqüentemente, a participação da indústria farmacêutica, representada por CLOWES e WALDEN (1922), destaca-se como responsável pelo refino do processo de isolamento e de produção, em larga escala, da insulina tanto bovina quanto suína (BLISS, 1993). O avanço culmina com a disponibilidade da nova droga para o tratamento de pacientes diabéticos em todo o mundo.

O uso da insulina exógena aumenta sensivelmente a sobrevida de pacientes diabéticos e revoluciona o manejo da doença, mas não evita o desenvolvimento de significativa morbidade e mortalidade. Em razão de à insulina carecerem plenas propriedades para o controle adequado do diabetes, outras modalidades terapêuticas continuaram a ser pesquisadas, com destaque para a reposição de células *beta*.

### 2.1.1 Reposição de Células Beta como Terapia para Controle do Diabetes

Atingir adequado controle glicêmico, sem a utilização de insulina, em fase precoce do diabetes tipo I (antes do aparecimento das complicações secundárias) representaria um grande avanço terapêutico.

De acordo com o estudo de controle e de complicações do diabetes mellitus tipo I (DCCT/EDIC, 2002), o rígido controle da hiperglicemia mediante insulinoterapia por um período superior a sete anos impediu a progressão da retinopatia, da nefropatia e da neuropatia diabética. Entretanto, complicações estabelecidas não se reverteram e, mais, o risco de hipoglicemia severa intensificou-se, em incidência que atingiu proporções triplicadas (International Pancreas Transplant Registry, [www.iptr.umn.edu](http://www.iptr.umn.edu), 2003).

O transplante de pâncreas pode corrigir as anormalidades metabólicas do diabetes e constitui, praticamente, a única terapêutica eficaz na normalização dos níveis de hemoglobina glicosilada em pacientes portadores de diabetes tipo I – o mais importante fator estabilizador ou de reversão das complicações microvasculares da doença (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 2002). Um transplante de pâncreas bem-sucedido resulta em normoglicemia duradoura e em um

estado de insulinoindpendência (MOREL; GOETZ; MOUDRY-MUNNS, 1991) que pode reverter tanto as alterações renais em pacientes com nefropatia diabética inicial (FIORETTO; STEFFES; SUTHERLAND, 1998); quanto a neuropatia sensorial periférica (KENNEDY; NAVARRO; GOETZ, 1990); além de estabilizar uma retinopatia diabética avançada (RAMSAY, 1988) e de resultar em uma melhora significativa na qualidade e na duração de vida dessa pessoa (ZEHRER e GROSS, 1991; OJO *et al.*, 2001).

Entretanto, destaquem-se algumas considerações importantes com relação ao transplante de pâncreas como modalidade terapêutica para pacientes portadores de diabetes tipo I. Repense-se o conceito de que todos os pacientes com diabetes poderiam ser transplantados precocemente após o diagnóstico da doença, uma vez que a escassez de órgãos disponíveis impossibilita um atendimento em grande escala - aproximadamente 1.400 casos são realizados por ano nos EUA (International Pancreas Transplant Registry, [www.iptr.umn.edu](http://www.iptr.umn.edu), 2003) e até 2004, apenas 745 casos foram relatados no Brasil (pâncreas isolado: 2001=25; 2002=42; 2003=50; 2004=70; pâncreas/rim: 2001=92; 2002=143; 2003=163; 2004=160) (Registro Brasileiro de Transplantes, 2004). O transplante de pâncreas exige um procedimento cirúrgico de médio a grande porte, que não pode ser indicado a pacientes portadores de comorbidades graves (cardiovascular, vascular periférica, além de outras). Dispensa-se a utilização de todo tecido pancreático para a obtenção de independência de insulina, haja vista que apenas as ilhotas de Langerhans bastam para a manutenção da homeostase da glicose. De fato, a privação da porção exócrina do pâncreas no recipiente contribuiria significativamente para redução de complicações do transplante pancreático.

O isolamento de ilhotas pancreáticas mediante digestão por collagenase (LACY e KOSTIANOVSKY, 1967) tornou o transplante factível, com resultados excelentes em experimentos envolvendo pequenos animais (YOUNOSZAI, SORENSON, LINDALL, 1970; BALLINGER e LACY, 1972; RECKARD, ZIEGLER, BARKER, 1973; PANIJAYANOND, SOROFF, MONACO, 1973), o que gerou um acentuado otimismo com relação à nova modalidade terapêutica de

reposição de células *beta*. O fato de o transplante de ilhotas corrigir os defeitos metabólicos básicos da hiperglicemia e estabilizar ou reverter lesões secundárias precoces em animais estimulou a utilização dessa mesma terapêutica em humanos. Saliente-se que muitos fatores limitantes ao transplante de pâncreas comprovam-se evitáveis quando se recorre ao transplante de ilhotas. Este tipo de transplante revela-se uma opção terapêutica que se utiliza com grande entusiasmo e poderá ter sua indicação ampliada para uma esfera mais abrangente, beneficiando uma população maior de pacientes diabéticos, inclusive alguns portadores do tipo II da doença com indicações específicas.

A era pré-moderna (1990-2000) do transplante de ilhotas teve início quando se descreveu a técnica de isolamento e de purificação de ilhotas humanas, em relativa larga escala por RICORDI *et al.*, 1988. Utilizando essa técnica, SCHARP *et al.* reportam dependência de insulina temporária e níveis glicêmicos quase normais em um paciente portador de diabetes tipo I, após receber um enxerto contendo aproximadamente 800.000 ilhotas isoladas e purificadas. Dois anos mais tarde, o grupo de Edmonton, Canadá, relata independência prolongada de insulina (maior do que um ano) em dois receptores de enxerto de ilhotas pancreáticas que receberam 243.000 e 368.000 ilhotas, respectivamente (WARNOCK, 1992). Tais relatos figuram, entre outros, como os primeiros experimentos a provarem o princípio de que a terapia de reposição de células *beta* por transplante de ilhotas de Langerhans eliminaria a necessidade de insulina exógena em um seleto grupo de pacientes diabéticos. Durante esse período (1990-2000) vários casos de sucesso, após autotransplante de ilhotas em pacientes submetidos a pancreatectomia total por doenças benignas, foram relatados na literatura (WHITE, 2000). Entretanto, mesmo com a superação de vários desafios técnicos no isolamento e na purificação das ilhotas de pâncreas humano (LONDON *et al.*, 1994), o transplante alogênico de ilhotas para tratamento de diabetes tipo I apenas sofrivelmente se mostrava efetivo.

De acordo com a compilação de BRENDEL, em 2001, dos 355 transplantes alográficos realizados em adultos, portadores de diabetes tipo I, entre 1990 e 1999, apenas 19% dos receptores atingiram independência de insulina por mais de sete dias,

e apenas 11% desses pacientes mantiveram independência desse hormônio por um período de um ano. A três significativos obstáculos atribui-se a falha em se atingir e em se manter a independência de insulina exógena de uma maneira mais consistente: 1) o transplante de uma massa insuficiente de ilhotas viáveis, 2) o uso de imunossupressão diabetogênica, e 3) a perda tanto precoce quanto tardia do enxerto em razão de mecanismos de lesão inespecíficos e aloespecíficos, bem como de recidiva autoimune do diabetes mellitus tipo I (HERING e RICORDI, 1999).

Uma cuidadosa análise retrospectiva dos poucos casos de sucesso demonstrou que transplantes alogênicos de ilhotas poderiam ser bem-sucedidos se: i) a massa de ilhotas transplantada fosse superior a 8.000 equivalentes de ilhotas (EI)/kg de peso (geralmente obtida com o isolamento de ilhotas provenientes de mais de uma glândula); ii) a possibilidade de realização de implante intraportal; iii) a possibilidade de o teor de pureza do purificado de ilhotas atingir níveis superiores a 50%; iv) a possibilidade de utilização de um agente anti células T. A percentagem de pacientes que se tornou insulino independente ( $> 1$  semana) após transplante de ilhotas preenchendo os critérios supracitados foi de aproximadamente 35% (BRENDEN, 2001)

Os resultados de um estudo clínico realizado na Universidade de Alberta, em Edmonton, em julho de 2000, mudam a perspectiva do transplante de ilhotas pancreáticas. SHAPIRO *et al.* transplantam uma massa adequada de ilhotas mediante implantes seqüenciais provenientes de 2-4 doadores, e reduzem a demanda metabólica ao enxerto evitando corticosteróides (sabidamente diabetogênicos) e elevadas doses de inibidores da calcineurina, e previnem, dessa maneira, a perda imunológica do enxerto utilizando um esquema de imunossupressão combinando sirolimus e tacrolimus. O protocolo de Edmonton (como ficou conhecido) incluiu todos os critérios ‘padrão ouro’ e, ao mesmo tempo, deu enfoque a outros obstáculos previamente citados. O resultado inicial desse estudo destaca a restauração da normoglicemia e a independência de insulina em 100% de receptores diabéticos tipo I (n=7) portadores de doença lábil e com episódios freqüentes de hipoglicemia grave. Publicações mais recentes da experiência do grupo de Edmonton incluem 24 pacientes. A percentagem



de receptores que atingiram insulinoindpendência é de 85% em 1 ano e de 70% em 2 anos (SHAPIRO *et al.* 2002). Resultados mais detalhados da evolução do tratamento, bem como resultados de exames metabólicos desses mesmos pacientes, foram relatados em dois artigos de seguimento (RYAN *et al.*, 2001 e RYAN *et al.*, 2002). A experiência do grupo até o início de 2003 abrangia mais de 50 pacientes.

Os resultados do grupo de Edmonton têm sido confirmados por outras instituições, com a observação de reversão do diabetes após transplante de ilhotas em receptores portadores de enxerto renal prévio estável (KAUFMAN *et al.*, 2002), e após transplante de ilhotas preparados utilizando-se pâncreas provenientes de doadores cadavéricos sem batimentos cardíacos (MARKMANN *et al.*, 1999). Mesmo com o sucesso relatado recentemente, persiste, denunciando-se como um dos pontos críticos do transplante de ilhotas, a necessidade do isolamento de ilhotas provenientes de glândulas pancreáticas obtidas de diferentes doadores. A perda da massa celular que ocorre no enxerto no período peri-transplante, bem como as possíveis alternativas terapêuticas para contornar tal problema centralizam o interesse de um grande número de pesquisadores envolvendo ilhotas de Langerhans a partir dos anos 90.

## 2.2 MECANISMOS DE MORTE CELULAR NAS CÉLULAS DAS ILHOTAS DE LANGERHANS

No processo de isolamento e purificação de ilhotas pancreáticas, utilizam-se regularmente a enzima collagenase (digestão pancreática) e o gradiente Ficoll (separação das ilhotas por gradiente de densidade). JAHR e cols. (1995) avaliaram a capacidade de essas duas substâncias ativarem o complemento humano mediante incubação, por 45 minutos, a 37°C, na presença de plasma fresco ou armazenado em nitrogênio líquido proveniente do sangue de doadores saudáveis. Dosaram-se os produtos de complemento ativado por imunoensaio. Os resultados demonstraram que o gradiente Ficoll ativa a via clássica, mas, também que a enzima collagenase revela a capacidade de ativar as duas vias do complemento. Quando presentes em ilhotas

utilizadas para transplante, essas substâncias induzem reações inflamatórias locais, comprometendo a viabilidade do enxerto.

A elevada taxa de insucesso e a perda de até 60% do enxerto de ilhotas pancreáticas em 3-6 meses em macacos *Rhesus* levou THOMAS e cols. (1999) a pesquisarem os mecanismos de morte celular envolvidos. O grupo chegou à conclusão de que ilhotas pancreáticas isoladas completamente do tecido exócrino apresentam uma significativa taxa de morte celular nas primeiras 48 horas após o isolamento como resultado de apoptose. Em contraste, ilhotas pancreáticas separadas apenas parcialmente de sua matriz extracelular, preservando-se o que se denomina “manto”, permanecem viáveis por período superior em cultura e apresentam resultados superiores nos testes de secreção de insulina. Quando se provoca o bloqueio de apoptose mediante separação da matriz extracelular das células, processo denominado *anoikis* (em grego, palavra que significa ausência de habitação), utilizando-se a proteína antiapoptótica Bcl-2, a viabilidade das ilhotas isoladas se mostra superior tanto *in vitro* como *in vivo*. Outro estudo utilizando o mesmo modelo também demonstrou que as ilhotas recentemente isoladas, quando desprovidas da matriz extracelular, sofrem apoptose via ativação das vias intrínseca e extrínseca, bem como da via de apoptose independente das caspases (THOMAS *et al.*, 2001).

Contribuem igualmente para falência de enxertos de ilhotas pancreáticas tanto a adaptação dessas mesmas ilhotas no órgão de implante quanto a ocorrência ou não de hiperglicemia. Em razão do processo de digestão pancreática, quando se implantam as ilhotas, elas se encontram desprovidas de vasos sangüíneos e de nervos (CLAYTON e LONDON, 1996), diferentemente do procedimento que ocorre quando se transplanta todo o parênquima pancreático. CARLSSON e cols. (1998) mediram a tensão de oxigênio ( $\text{PaO}_2$ ) antes e depois da revascularização em ilhotas pancreáticas transplantadas sob a cápsula renal e correlacionaram os achados com hiperglicemia aguda e crônica nos receptores, bem como valores de tensão de oxigênio nas ilhotas em seu leito nativo pancreático. A  $\text{PaO}_2$  encontrada no pâncreas exócrino foi de 20-23 mmHg versus 31-37 mmHg nas ilhotas. A média da  $\text{PaO}_2$  no dia posterior ao transplante nas ilhotas foi de metade da encontrada em ilhotas do pâncreas nativo (14-

19 mmHg) e não acusou diferenças entre receptores normoglicêmicos e diabéticos. Um mês após o transplante, quando a revascularização já ocorrera, a  $\text{PaO}_2$  nos enxertos foi de 9-15 mmHg em animais normoglicêmicos, mas de 6-8 mmHg em recipientes diabéticos. Em ambos os grupos, a perfusão sanguínea, mensurada por Doppler, não foi significativamente diferente. Os autores concluíram que a  $\text{PaO}_2$  em ilhotas transplantadas reduziu-se no período pós-transplante e que a hiperglicemia exerce influência no decréscimo adicional da tensão de oxigênio (SANDLER e JANSSON, 1987; JANSSON, e SANDLER, S. 1989).

A BAX apresenta-se como uma proteína indutora da morte celular (YIN, X.M.; OLTVAI e KORSMEYER, 1994; OLTVAI e KORSMEYER, 1994). THOMAS e cols. (2002) demonstram um aumento significativo da expressão desta proteína pró-apoptótica em ilhotas humanas isoladas sugerindo um mecanismo molecular na indução de morte celular por apoptose em células *beta*. O fato de esta expressão aumentada de BAX acompanhar-se da menor expressão de uma das proteínas anti-apoptóticas, a Bcl-2, reforça a hipótese de que a perda de ilhotas no pós-transplante pode ser minimizada caso se controle a ativação de BAX e das PIAs mediante manipulação genética (THOMAS et al., 2002).

A exposição de ilhotas pancreáticas a uma combinação de citocinas ( $\text{IL-1}\beta$ = interleucina- $1\beta$ , FNT= fator de necrose tumoral- $\alpha$  e  $\text{IFN-}\gamma$ = interferon- $\gamma$ ) desencadeia intensa disfunção na secreção de insulina pelas células beta (EIZIRIK *et al.*, 1994). DELANEY e cols. (1997) demonstram que a incapacidade das ilhotas secretarem níveis normais de insulina, após insulto inflamatório, por essa combinação de citocinas por 6-9 dias em cultura, associa-se à fragmentação de DNA e morte celular por apoptose. Tanto no modelo autoimune de diabetes tipo I como no transplante alográfico de ilhotas se faz presente uma resposta imunopatogênica mediada por um subgrupo Th1 de células T, caracterizada pela secreção de IL-2,  $\text{IFN-}\gamma$  e FCT- $\beta$ = fator de crescimento tumoral- $\beta$ . Em ambas as situações, as primeiras células inflamatórias a se infiltrarem nas ilhotas são os macrófagos que, por sua vez, secretam preferencialmente  $\text{IL-1}\beta$ , FCT- $\alpha$  e  $\text{IFN-}\gamma$  (TRINCAVELLI *et al.*, 2002).

O diabetes do tipo I apresenta-se como uma doença autoimune que resulta da destruição das células *beta* pancreáticas por células auto-reativas e seus mediadores, especialmente citocinas (SJOHOLM, 1998; KREUWEL, SHERMAN, 2001). Vários estudos recentes elegem, como foco principal, o papel da apoptose celular nos eventos que culminam com a destruição imunomediada de células *beta* *in vitro* e *ex vivo*. LALLY e cols. (2001) biopsiaram o pâncreas de ratos com propensão ao diabetes BB/S e de ratos diabetorresistentes e demonstraram que o aparecimento de células *beta* apoptóticas, em animais propensos, acusou presença com apenas 68 dias de vida, bem antes do aparecimento clínico do diabetes (LALLY, RATCLIFF, BONE, 2001). AUGSTEIN e cols. (1998) já haviam demonstrado previamente que a frequência de apoptose de células *beta* correlacionava-se diretamente com a progressão da destruição das ilhotas e declínio no controle glicêmico.

O diabetes tipo II caracteriza-se por uma insulinoresistência assintomática que precede o aparecimento da doença. YAGIHASHI (1996), em autópsias de indivíduos diabéticos, mediante estudo, encontrou sensível diminuição na massa de células *beta* na maioria de indivíduos diabéticos comparado à de células *beta* de indivíduos normoglicêmicos. Uma massa menor de células *beta* poderia ser resultado de menor proliferação ou de uma excessiva taxa de morte celular. Vários estudos demonstram que, *in vitro*, ácidos graxos livres, glucose, sulfoniluréia e um hormônio insular chamado amilina podem causar apoptose de células *beta*. Todas essas evidências sugerem que a morte celular programada poderia estar também envolvida na etiologia do diabetes tipo II (SCHWINGSHACKL *et al.*, 1988; SHIMABUKURO *et al.*, 1998; GARRATT *et al.*, 1999; FEDERICI *et al.*, 2001; MAEDLER *et al.*, 2002).

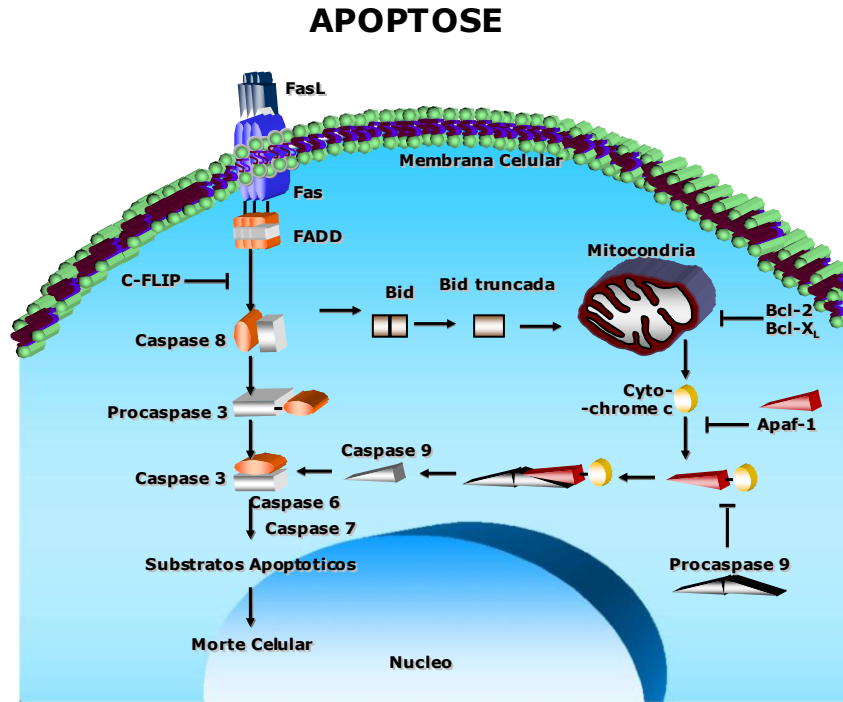
### 2.3 HOMEOSTASE E VIAS DE SINALIZAÇÃO DA MORTE CELULAR

As células dos mamíferos apresentam um sistema extremamente complexo de balanço entre proliferação e morte celular que assegura um equilíbrio preciso da homeostase tecidual. Alterações nos processos envolvidos na morte celular podem

potencialmente acarretar anormalidades de desenvolvimento celular, autoimunidade, degeneração neural e imortalidade celular, como as observadas em diversas entidades neoplásicas. Desta maneira, o desenvolvimento de técnicas que contemplem a modulação das vias componentes do processo de morte celular impõe-se como fundamental tanto na prevenção terapêutica quanto no manejo clínico de diversas doenças humanas. Apesar de se reconhecer, por um lado, que a morte celular ocorre mediante ação de múltiplos fatores, sabe-se, por outro lado, que a família das caspases (proteases da cisteína), que regula a apoptose, agem proteoliticamente entre si, e constituem as proteínas-chave intracelulares responsáveis pela destruição celular. A família dos genes inibidores da apoptose fornece proteção contra estímulos externos indutores da morte celular.

Já se descreveram dois processos convergentes de apoptose, a saber: via intrínseca e via extrínseca (VERHAGEN, COULSON, VAUX, 2001; SALVESEN e DUCKETT, 2002; STENNICKE, RYAN, SALVESEN, 2002) (FIGURA 1). A via extrínseca requer ligação de receptores específicos de morte celular localizados na superfície celular. Esses receptores integram um subgrupo especializado da superfamília dos receptores do fator de necrose tumoral (TNF-R) que incluem: CD95/Fas/Apo-1 (o mais estudado), TNF-R1 (receptor 1 do fator de necrose tumoral), e D3 (receptor 3 de morte celular) (HOLCIK *et al.*, 2001). Resumidamente, após a agregação do receptor pelo ligante Fas, proteínas intracelulares são recrutadas para regiões citoplasmáticas relacionadas com os receptores de morte a fim de formar o complexo de sinalização de morte (CSM). O CSM contém proteínas adaptáveis que recrutam pró-caspase 8 (caspase iniciadora), o que resulta em auto-ativação da caspase 8. A caspase 8, por sua vez, ativa a pró-caspase 3 (caspase efetora e executora) que induz à morte celular.

FIGURA 1 - DIAGRAMA ILUSTRATIVO DAS VIAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE APOPTOSE CELULAR.



A via apoptótica intrínseca, ou mitocondrial, depende de uma disfunção da mitocôndria e se deflagra mediante sinalização intracelular em reação a estímulos diversos, entre eles a hipóxia. Acredita-se que nesta via se estabeleça a translocação de membros da família pró-apoptótica Bcl-2 na mitocôndria. Tal fenômeno induziria à permeabilização da membrana mitocondrial externa e extravasamento de efetores pró-apoptóticos no citossol. Um desses efetores, o citocromo *c*, pode se ligar à molécula Apaf-1 na presença de ATP para formar o “apoptossomo” que, subsequente, recruta e ativa a pró-caspase 9 que estimulará as caspases efetoras (caspases 3,6,7). Outro efector mitocondrial liberado identifica-se como o fator de indução da apoptose (FIA) que transloca para o núcleo e causa fragmentação de DNA de alto peso molecular em algumas células, sendo este mecanismo caspase-independente (SALVESEN e DUCKETT, 2002).

## 2.4 TERAPIA GÊNICA NA PROTEÇÃO DE ILHOTAS DE LANGERHANS

Recentemente, avanços têm sido registrados no desenvolvimento de vetores capazes de transferir genes para o interior de células (SALDEEN *et al.*, 1996; LEIBOWITZ *et al.*, 1999; GIANNOUKAKIS *et al.*, 1999); o significado clínico desta tecnologia se traduz na possibilidade de se alterar a expressão de genes em células das ilhotas por meio de produção aumentada e/ou reduzida de proteínas específicas. Vetores adenovirais que transferem genes de uma maneira temporária já se encontram disponíveis; entretanto, sua expressão geralmente não ultrapassa 80 dias. Mesmo temporários e com o risco questionável de transferência de carga viral a receptores geralmente imunossuprimidos, esses vetores podem ser utilizados em modelos animais e ajudar na confirmação de teoria definindo quais genes seriam úteis na proteção de ilhotas. Na tentativa de se minimizarem as conseqüências de uma possível tempestade de citocinas no receptor, desenvolveu-se o vetor adenovírus *gutless*, removendo-se-lhe a maior parte de sua estrutura viral e, conseqüentemente, coibindo a geração de uma resposta autoimune contra as células infectadas (CHEN, 1997). Os lentivírus, um tipo de retrovírus, constituem um grupo atrativo de vetores, uma vez que podem transduzir genes para o genoma de células que não se encontrem em processo de divisão, incitando tais células a preservarem bagagem genética até a morte celular (NALDINI *et al.*, 1996; BLOMER *et al.*, 1996; FISHER *et al.* 1997).

Moléculas propensas à manipulação genética, presentes nas ilhotas, poderiam conferir proteção contra determinadas injúrias, tanto em casos de rejeição após transplante alogênico quanto de destruição autoimune. EFRAT e cols. (1995) conseguiram prolongar a sobrevida de enxerto de ilhotas pancreáticas alográficas, em camundongos, recorrendo a uma transdução de um vetor viral carreador do gene E3. O gene em questão codifica quatro diferentes proteínas cuja capacidade de inibir resposta imune se realiza mediadas por linfócitos T citotóxicos e fator de necrose *alfa* no receptor.

A imunoglobulina CTLA-4, quando excretada em maior quantidade por ilhotas manipuladas geneticamente, torna-se capaz de retardar a rejeição valendo-se de

um mecanismo de “desarme” dos linfócitos invasores do enxerto (STEURER *et al.*, 1995; FENG *et al.*, 1999). Ilhotas de camundongos tratadas com cDNA-CTLA4Ig pré-transplante ampliam as perspectivas de sobrevida em proporção seis vezes maior quando comparadas a ilhotas não tratadas. Histologicamente, os enxertos expressando CTLA4Ig apresentam-se circundados por espesso infiltrado monomorfonuclear, mas a arquitetura e, conseqüentemente, a função das ilhotas é preservada (GAINER *et al.*, 1997).

Vários autores buscam avidamente uma modulação das moléculas envolvidas na ativação e na proliferação linfocitária após contato com antígenos do enxerto. O grande desafio neste campo centra-se no fato de o processo caracterizar-se como multifatorial, exigindo, assim, ações combinadas em moléculas distintas. A molécula CD40L (CD154) produz um efeito similar ao da molécula CTLA4-Ig, ambas constituindo sinais co-estimulatórios de células T. Sua expressão aumentada localmente no enxerto poderia contribuir para um estado de imunotolerância. Consideram-se promissoras as interleucinas 4 e 10 em questões que dizem respeito à proteção de enxertos de ilhotas, já que se associam à prevenção de destruição autoimune de ilhotas em camundongos não obesos diabéticos (NOD); seu mecanismo de ação, basicamente, consiste em uma mudança da resposta imunológica destrutiva do receptor (Th1) para uma resposta toleragênica (Th2) (RABINOVITCH *et al.*, 1995). Outras moléculas de interesse que igualmente demonstram potencial de tolerância gênica já foram descritas em enxertos de ilhotas de Langerhans : TGF $\beta$  (ZECKZER *et al.*, 1997; KING *et al.*, 1998), inibição da interleucina-12 (YASUDA *et al.*, 1998), o antagonista do receptor de interleucina 1 e receptores solúveis de TNF tipo 1 (GIANNOUKAKIS *et al.*, 1999).

Além da modulação inflamatória sistêmica e localizada nas ilhotas de pacientes com diabetes tipo I ou nos enxertos alográficos, outra maneira de melhorar a sobrevida de ilhotas seria a terapia gênica para aumentar os mecanismos de defesa internos das células *beta*. Várias proteínas podem proteger ilhotas contra apoptose e contra lesões provocadas por radicais oxidativos. A terapia gênica induziria as células *beta* a expressar de uma maneira aumentada enzimas como catalase, dismutase,



glutathion peroxidase, heme-oxidase, assegurando, portanto, proteção contra lesões oxidativas. Outra alternativa aponta para os genes antiapoptóticos A20, Bcl-xL, FLIPs e Myd88 (CHAO *et al.*, 1995; SARMA *et al.*, 1995). Por suas características anti-apoptóticas relacionadas com a via intrínseca de sinalização da morte celular, o gene Bcl-2 foi estudado com entusiasmo na proteção de ilhotas pancreáticas. Porém, resultados benéficos da expressão aumentada do gene em questão (LIU *et al.*, 1996; IWAHASHI *et al.* 1996; RABINOVITCH *et al.*, 1999; CONTRERAS *et al.*, 2001a; CONTRERAS (B) *et al.*, 2001b; CONTRERAS *et al.*, 2002) contrastam com indícios de ineficácia da proteína Bcl-2, não apenas em processos de inibição apoptótica *in vitro* em células *beta* após agressão mediante citocinas (BARBU, AKUSJARVI, WELSH, 2002), mas também na inibição da destruição autoimune em um modelo animal de diabetes (ALLISON *et al.*, 2000). Outras moléculas encontram-se em fase de teste, e a manipulação genética se destaca como uma alternativa terapêutica promissora que se evidencia, a cada dia, mais útil no manejo de doenças.

## 2.5 AS PROTEÍNAS INIBIDORAS DA APOPTOSE (PIA)

O desequilíbrio que se estabelece entre componentes funcionais que controlam a morte celular poderia desencadear a patogenia de diversas doenças e modelos de injúria celular. Proteínas inibidoras da apoptose têm se destacado como inibidoras intrínsecas importantes da cascata das caspases e representam fatores regulatórios críticos na sinalização apoptótica (HOLCIK, GIBSON, KORNELUK, 2001; VERHAGEN, COULSON, VAUX, 2001; SALVESEN, DUCKETT, 2002; STENNICKE, RYAN, SALVESEN, 2002). Até o presente momento, identificaram-se oito PIAs humanas que são caracterizadas por um domínio rico em cisteína, com aproximadamente setenta aminoácidos chamado de repetição baculoviral (LOTOCKI e KEANE, 2002).

A proteína inibidora de apoptose neuronal (NAIP) impôs-se como a primeira PIA descoberta e, quando ausente em neurônios motores da medula espinhal causa ou contribui para o desenvolvimento de atrofia muscular medular. Essa proteína tem sido

detectada no fígado adulto, na placenta, na medula espinhal, em adipócitos, em linfócitos e em fibroblastos (VERHAGEN, COULSON, VAUX, 2001). Em seguida, as c-IAP-1 e c-IAP-2 foram associadas ao mecanismo de sinalização do receptor do fator de necrose tumoral 2 e parece encontrarem-se presentes na maioria dos tecidos (KEANE *et al.*, 2001a; KEANE *et al.*, 2001b). A quarta PIA descrita identifica-se como o fator inibidor de apoptose ligado ao cromossomo X (XIAP). Inicialmente estudada em drosophilas, seu correspondente humano foi descrito em seguida (hILP). Como outras c-IAPs, a XIAP foi detectada na maioria dos tecidos (exceto em leucócitos) e se localiza no citoplasma celular. Logo após a descoberta da XIAP, um novo gene humano que codifica uma PIA única em estrutura foi descrita: survivina. Embora, em situações normais, não se detecte essa proteína em tecidos adultos, ela se encontra presente em tecidos fetais (VERHAGEN, COULSON, VAUX, 2001). BRUCE descreve outra PIA, que se relaciona estreitamente com o complexo de Golgi e, praticamente, está presente em todos tecidos adultos. Seu homólogo humano é conhecido como *apollon*, cuja presença se detecta em vários tipos de câncer e, provavelmente, associe-se ao processo de tumorigênese (CHEN *et al.*, 1999). Recentemente, outras duas PIAs foram descritas: ML-IAP e ILP-2, envolvidas na inibição da apoptose induzida por receptores de morte após terapia com agentes quimioterápicos e da via apoptótica intrínseca por ação direta no bloqueio específico da caspase 9, respectivamente (HOLCIK, GIBSON, KORNELUK, R.G, 2001).

### 2.5.1 Modelos de Injúria Tecidual e Expressão de Pia

No sistema nervoso as Pia oferecem proteção a alguns tipos específicos de neurônios lesados. XU e cols (1999) demonstraram que a expressão aumentada de XIAP, mediada por vetor viral, pode prevenir a perda neuronal isquêmica no hipocampo, e preservar a função de neurônios CA1 (XU *et al.*, 1999). Além disso, expressão aumentada de NAIP, c-IAP-1 e c-IAP-2 recupera neurônios motores após axotomia em nervo periférico (PERRELET *et al.*, 2000).

VERHAGEN e cols. (2001) analisaram os efeitos da expressão aumentada da proteína XIAP sob o controle de um promotor específico de células T. Os resultados mostraram claramente resistência por parte de linfócitos T a diversos indutores de apoptose e diferença significativa no número de células T nos tecidos linfóides (VERHAGEN, COULSON, VAUX, 2001).

SIMONS e cols. (1999) demonstraram, em cultura de células, que a transdução de neurônios primários cerebelares com adenovírus codificando NAIP, XIAP, c-IAP-1 e c-IAP-2 retardou, mas não preveniu apoptose induzida por privação de soro e por despolarização de  $K^+$ . Esse grupo de PIA não influenciou a morte celular por necrose induzida por L-glutamato; o que leva à suposição de que algumas integrantes da família de inibidoras de apoptose podem mostrar-se insuficientes para resguardar alguns tipos específicos de neurônios de injúria isquêmica.

Modelos de hipóxia cerebral induzida por asfixia e de hipóxia intensa tubular renal em ratos confirmaram que a expressão aumentada de XIAP e de c-IAP-2 denuncia íntima relação com uma menor ocorrência de morte celular por apoptose (KATZ *et al.*, 2001; DONG *et al.*, 2002). A relação das interações que se estabelecem entre essas PIAs e a complexa cascata das caspases concentra volumosa e intensa pesquisa. O estudo individualizado e detalhado das integrantes da família de inibidoras da apoptose representa uma estratégia terapêutica única aplicável a diversos tipos de doenças.

## 2.6 A PROTEÍNA INIBIDORA DA APOPTOSE SURVIVINA

### 2.6.1 Estrutura da proteína survivina

A survivina identifica-se como a proteína inibidora da apoptose de menor peso molecular (16.5 kDa) (SALVESEN e DUCKETT, 2002). Estruturalmente ela contém apenas uma repetição do baculovírus, uma sequência de setenta aminoácidos (conformação *zinc finger* comum a todas as proteínas da família das PIAs) e um grupo  $-COOH$  (AMBROSINI, ADIDA, ALTIERI, 1997). Baseado em cristalografia por

raio-X da proteína humana (CHANTALAT *et al.*, 2000) e murina (MUCHMORE *et al.*, 2000), a survivina consiste em um homodímero estável em solução. Uma única cópia do gene survivina localizada no cromossomo 17q25 (humano) (LI *et al.*, 1998) ou 11E2 (murino) (LI e ALTIERI, 1999) dá origem ao aparecimento de três transcrições diferentes: *wild-type*, survivina-2B e survivina  $\Delta$ ex-3 (MAHOTKA *et al.*, 2002).

### 2.6.2 Survivina e Neovascularização

A expressão basal de survivina em células endoteliais (CE) normais mostra-se praticamente nula, mas a presença tanto do fator de crescimento do endotélio vascular (FCEV) quanto do fator de crescimento de fibroblastos (FCF) induz o aumento de RNAm e da expressão da proteína survivina de dez a vinte vezes; em contrapartida, esses fatores de crescimento não oferecem nenhum efeito estimulante significativo com a XIAP (TRAN *et al.*, 1999). Experimentos realizados por O'CONNOR e cols. (2000 a), com CE provenientes de brotos vasculares de cauda de ratos, mostram que a formação tridimensional vascular da matriz composta de colágeno tipo I e fibronectina associa-se à forte expressão de survivina. Além disso, o mesmo grupo provou que a expressão de survivina encontra-se significativamente aumentada no citoplasma de CE presentes no tecido de granulação proveniente de pele inflamada, mas inexistente nos capilares não-proliferativos da pele normal.

A expressão aumentada de survivina não está presente apenas nas CE, oferecendo proteção e aumento da viabilidade a tais células, mas também parece estar associada à proliferação da camada muscular lisa vascular e na formação da neoíntima após lesão vascular aguda. BLANC-BRUDE e cols (2002) demonstraram, em dois modelos de injúria vascular: coelhos com lesão arterial iliofemoral por balão e camundongos com lesão de artéria femoral por cateter, o aumento da expressão de survivina dois dias após a lesão provocada e o aparecimento de neoíntima visível no sétimo dia. A máxima expressão da proteína survivina e formação de neoíntima foi

detectada no décimo quarto dia após a lesão vascular, diminuindo após esse dia, mas mantida até por volta da sexta semana.

### 2.6.3 Survivina e Inibição da Apoptose

Três linhas diferentes de evidência experimental embasam o conceito de que a survivina consegue suprimir a morte celular; primeiro, porque a expressão aumentada de survivina inibe a apoptose iniciada pelas vias intrínseca e extrínseca do processo de morte celular programada (AMBROSINI, ADIDA, ALTIERI, 1997; KOBAYASHI *et al.*, 1999; MAHOTKA *et al.*, 1999; ISLAM *et al.*, 2000), segundo, porque a manipulação genética da proteína survivina *in vivo* cria fenótipos consistentes com a citoproteção por aumento de viabilidade celular em camundongos transgênicos (GROSSMAN *et al.*, 2000) e com o aumento da taxa de morte celular após inativação de alelo condicional (OKADA *et al.*, 2004); em terceiro lugar, antagonistas moleculares da proteína survivina, incluindo antisense, ribozimas, oligonucleotídeos siRNA (*small interfering RNA*) ou mutantes dominantes negativos causam morte celular mediada por caspases e aumento do estímulo apoptótico (LI *et al.*, 1999; KASOF *et al.*, 2001; OLIE *et al.*, 2000; KANWAR *et al.*, 2001; SHANKAR *et al.*, 2001; XIA *et al.*, 2002; CHOI *et al.*, 2003; WILLIAMS *et al.*, 2003). Achados recentes sugerem que a citoproteção oferecida pela survivina pode ser mais seletiva que a de outras PIAs, baseada principalmente no processo de iniciação apoptótica na mitocôndria. Tal fato se correlaciona com a formação de um complexo entre a survivina e a caspase 9 *in vivo* (O'CONNOR *et al.*, 2000 b), com a capacidade de a proteína survivina em prevenir a ativação da caspase 9 no interior de um apoptossomo funcional e com interações com a molécula SMAC-DIABLO liberada pela mitocôndria diante de estímulo nocivo à célula (SONG *et al.*, 2003). Além disso, a morte celular induzida por antagonistas da proteína survivina possui características da apoptose mitocondrial com liberação de citocromo *c* e alterações de potencial nas membranas mitocondriais (BELTRAMI *et al.*, 2004). Num conjunto, esses dados sugerem que a survivina, diferentemente das outras PIAs que inibem caspases

iniciadoras e/ou efetoras, pode ter como alvo seletivo o processo de ativação da caspase 9.

Apesar de sua descoberta relativamente recente em 1997, a proteína survivina tem atraído interesse considerável em diversos campos das ciências biomédicas, principalmente na oncologia, área em que sua presença funciona como marcador tumoral e fator prognóstico. Por sua característica antiapoptótica seletiva e por estar expressa, normalmente, apenas em tecidos fetais, sua manipulação genética oferece ferramenta ímpar tanto no estudo de proliferação celular em doenças degenerativas quanto na proteção de enxertos após transplante.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

As normas técnicas utilizadas neste trabalho seguiram as orientações da Associação Brasileira de Normas Técnicas (NBR-6023) de 2000, das Normas para Apresentação de Trabalhos da Universidade Federal do Paraná de 2002 e da *Nomina Anatomica Veterinária* de HABEL *et al*, 1994. Todos os experimentos foram realizados no laboratório de transplante e/ou no biotério do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade de Massachusetts (Worcester, MA, EUA), no período de outubro de 2002 a junho de 2005.

#### 3.1 ANIMAIS

Camundongos machos BALB/c (H-2<sup>d</sup>) e C57Bl/6b (H-2<sup>b</sup>) de 6-8 semanas de idade foram obtidos de Taconic Farms (#BALB e #B6, Taconic Farms, Germantown, NY, EUA). Os camundongos machos NOD/scid (H-2<sup>K</sup>) (#002313) bem como camundongos machos e fêmeas NOD/Ltj (H-2<sup>K</sup>) (#001976) de 6-8 semanas foram adquiridos no Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EUA). A cepa de camundongos transgênicos para survivina (NOD/Ltj-Tgn survivina) foi desenvolvida em colaboração com o centro de animais transgênicos do Jackson Laboratory, de acordo com o método descrito por GROSSMAN *et al*, 2000, mas utilizando-se o promotor rat-insulin em substituição ao promotor keratin-14. Submeteram-se os animais a um período de aclimação de uma semana no biotério da Universidade de Massachusetts, antes de qualquer experimento. Para o estudo de incidência de *diabetes mellitus* (DM), cruzaram-se camundongos das cepas NOD/Ltj e NOD/Ltj-Tgn survivina e analisaram-se suas progênes quanto ao desenvolvimento de insulite e hiperglicemia. O presente estudo obteve aprovação do Comitê Institucional de Cuidados e Uso dos Animais (IACUC), da Universidade de Massachusetts, mediante registro sob os números A-1417/A-1462/A-1467/A-1542, e seguiram-se as diretrizes que se estabelecem para o cuidado com animais vertebrados usados em pesquisa, proposto pelo governo norte-americano no Code of Federal Regulations of US Government, 2000.



### 3.2 ANESTESIA E MORTE DOS ANIMAIS

Durante os experimentos *in vivo* conduzidos neste trabalho, os camundongos foram anestesiados com uma mistura de ketamina 100 mg/kg (#161109 Webster, Sterling, MA, EUA) e xylazina 10 mg/kg (#57319, Phoenix Pharmaceutical, St Joseph, MO, EUA), dose individual, isto é, por camundongo, injetado intraperitonealmente em cada animal cinco minutos antes da realização do procedimento cirúrgico .

Os animais utilizados como doadores, tanto para estudos de transplante de ilhotas quanto para experimentos *in vitro*, após anestesiados, foram mortos por deslocamento cervical. Os animais receptores de um enxerto de ilhotas foram mortos recorrendo-se à inalação de CO<sub>2</sub> em câmara de gás, após a constatação do não funcionamento primário do enxerto (hiperglicemia persistente, uma semana após o transplante) ou após constatada a rejeição. Da mesma forma foram mortos os camundongos das cepas NOD/Ltj e NOD/Ltj-Tgn survivina, assim que se confirmou o desenvolvimento de DM, constatação obtida mediante utilização de duas medições seriadas de hiperglicemia sangüínea.

### 3.3 ISOLAMENTO DE ILHOTAS DE LANGERHANS

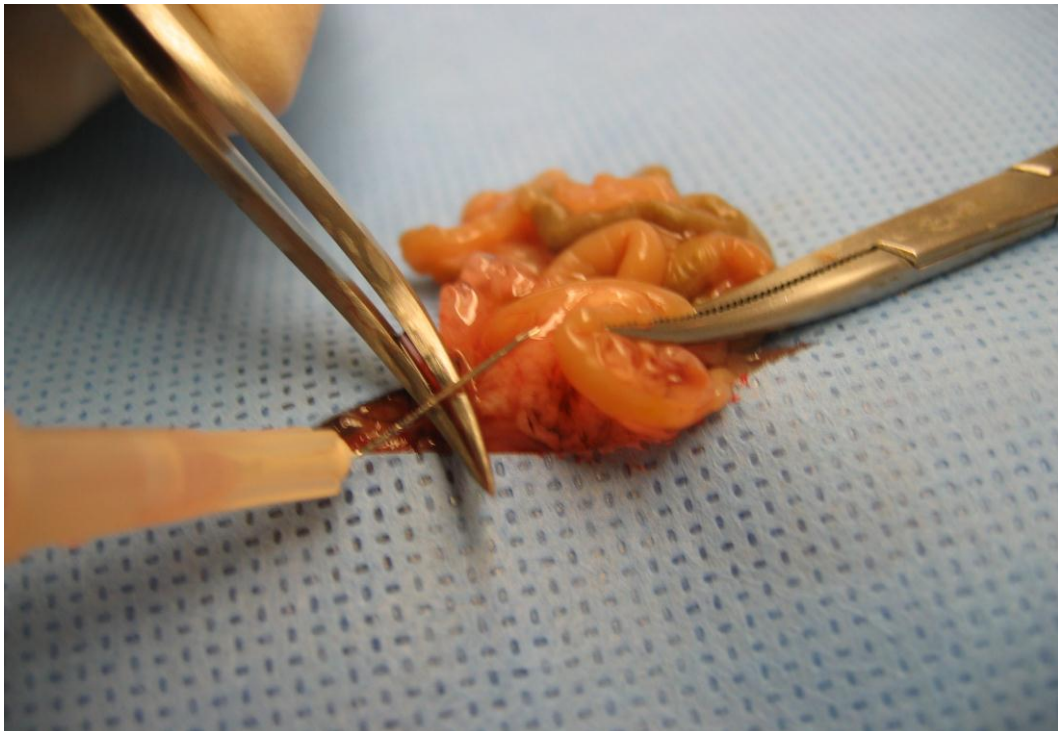
#### 3.3.1 Injeção de Colagenase E Pancreatectomia nos Doadores

Para os procedimentos de pancreatectomia recorreu-se a microscópio de dissecação, modelo AO569 (Reichert Scientific Instruments, Buffalo, NY, EUA), regulando-se a amplificação para uma dimensão decuplicada. Como doadores, selecionaram-se camundongos C57Bl/6 (H-2<sup>b</sup>) para os transplantes singênicos e camundongos BALB/c (H-2<sup>d</sup>) para todos os experimentos *in vitro*, assim como para os transplantes alogênicos. Anestesiaram-se e mataram-se os animais como anteriormente se descreveu. A seguir, os animais foram posicionados em decúbito dorsal e realizou-se anti-sepsia da parede abdominal com etanol a 70%. Realizou-se sequencialmente,

incisão abdominal subcostal bilateral com ressecção do apêndice xifóide, exposição da cavidade abdominal e dissecação do ducto hepático comum com seu isolamento logo após a união dos ramos direito e esquerdo. Clampeou-se a segunda porção do duodeno utilizando-se pinça mosquito na região da papila duodenal e, em seguida, procedeu-se à canulação do ducto hepático comum com agulha de 30½G (#305106 Becton Dickinson-BD, Franklin Lakes, NJ, EUA) angulada a 45° (FIGURA 2).

O pâncreas foi completamente distendido mediante injeção de 3ml de solução de colagenase V (#C-9263 Sigma Corporation, St. Louis, MO, EUA) no ducto biliar, utilizando-se concentração de 0.7 mg/ml, em solução salina balanceada de Hanks (#H6136 Sigma Corporation).

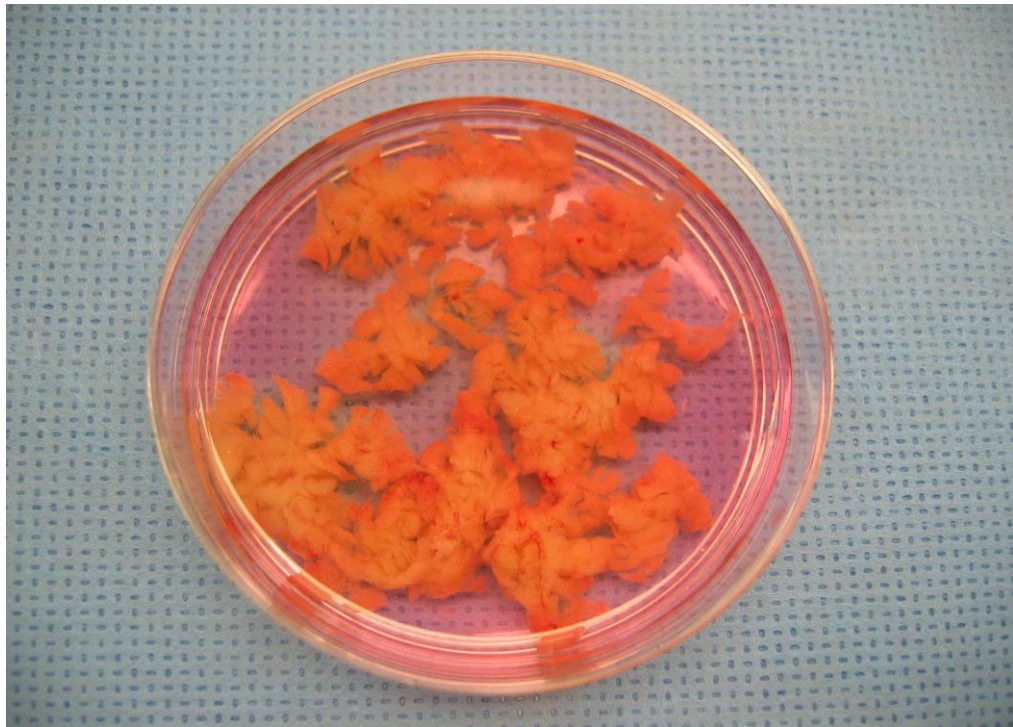
FIGURA 2 – INJEÇÃO INTRAPANCREÁTICA DE COLAGENASE. CANULAÇÃO DO DUCTO HEPÁTICO COMUM PARA INJEÇÃO DE COLAGENASE NO PÂNCREAS COM CLAMPEAMENTO PRÉVIO DA PAPILA NA SEGUNDA PORÇÃO DO DUODENO.



Excisou-se o tecido pancreático que, em seguida, foi colocado em uma placa de Petri de 60x15 mm (#352001 BD) (FIGURA 3), seccionado em pequenos

fragmentos com tesoura de íris e mantido em gelo. Após a pancreatectomia, distribuiu-se o tecido pancreático fragmentado em tubos de polietileno de 50 ml (#352098 Falcon, BD), contendo 3-4 órgãos fragmentados por tubo. Foram utilizados 3-7 doadores por receptor.

FIGURA 3 – ASPECTO DE TRÊS UNIDADES DE PÂNCREAS DISTENDIDOS MEDIANTE INJEÇÃO DE COLAGENASE EM PLACA DE PETRI



### 3.3.2 Digestão do tecido exócrino do pâncreas

Colocaram-se os tubos contendo o tecido pancreático em incubadora móvel (Fisher Scientifics, EUA) a 37°C, durante 9-13 minutos, de acordo com o lote da colagenase em utilização. Interrompeu-se a reação enzimática adicionando-se 40 ml de solução salina de Hanks, balanceada e gelada, com 10% de soro de bezerro (#35-010-CV, Cellgro, Miami, FL, EUA). Em seguida, manual e vigorosamente, agitaram-se os tubos durante trinta segundos e, após tal procedimento, foram esses recipientes submetidos a cinco ciclos (de duração cinco minutos cada ciclo) de centrifugação e lavagem a 1100 rotações por minuto, em centrífuga clínica (RT6000-D Du Pont,

EUA), com o dispositivo de freio desativado. Intercalados com os ciclos de centrifugação e de lavagem das ilhotas, procedeu-se à aspiração e ao desprezo dos elementos sobrenadantes, permitindo-se que permanecesse no frasco somente o precipitado (*pellet*) contendo as ilhotas de Langerhans. Adicionou-se solução balanceada de Hanks com 10% de soro de bezerro após a primeira centrifugação (40ml/frasco). Do terceiro ao quinto ciclo de centrifugação e de lavagem utilizou-se somente solução salina balanceada de Hanks gelada (40ml/frasco/ciclo). Após desprezo do sobrenadante e adição de nova solução ao precipitado, seguiu-se agitação manual do frasco até dissolução completa do precipitado antes de se iniciar o processo de centrifugação.

### 3.3.3 Purificação das ilhotas de Langerhans

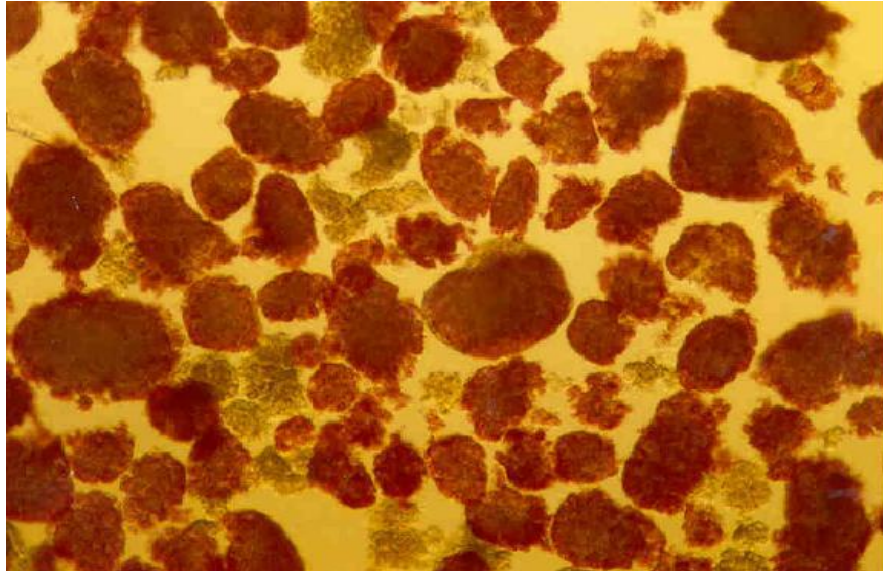
Após o último ciclo de centrifugação e de lavagem, adicionaram-se 50 ml de solução salina balanceada de Hanks gelada em cada frasco, tomando-se as necessárias precauções para se evitar a formação de bolhas no precipitado. Separaram-se as ilhotas de Langerhans do tecido exócrino do pâncreas recorrendo-se ao método de SALVALAGGIO, 2002. Resumidamente, submeteu-se a um processo de disjunção, utilizando-se um separador celular de 100 $\mu$ m (#352360, BD), o tecido exócrino pancreático digerido; em um momento posterior, lavaram-se as ilhotas e o tecido, suavemente, com 50 ml de solução salina balanceada de Hanks gelada. Em seguida, inverteu-se o separador celular (180°), e o seu conteúdo foi removido suavemente para o interior de placa de petri, de 100x15 mm (#351001 BD), mediante enxágue com 15 ml de solução salina balanceada de Hanks gelada.

### 3.3.4 Pureza e viabilidade das ilhotas de Langerhans

Pureza e viabilidade das ilhotas de Langerhans foram medidas em teste *in situ* da ditizona, descrito por BONNEVIE-NIELSEN, SKOVGAARD e LERNMARK, 1983. Transplantaram-se apenas ilhotas de Langerhans que acusaram viabilidade e teor

de pureza maior que 90% (FIGURA 4).

FIGURA 4 – ASPECTO FINAL DE UMA AMOSTRA DE ILHOTAS DE LANGERHANS CORADAS POR DITIZONA APÓS PURIFICAÇÃO. 200X



### 3.3.5 Contagem das ilhotas de Langerhans

Dispôs-se a solução final em uma placa de petri de 100x15mm. As ilhotas de Langerhans foram contadas com auxílio do microscópio de dissecação. Selecionaram-se apenas as ilhotas de Langerhans cujas membranas exibiram, além de aspecto livre de ruptura, diâmetro com dimensões entre 150-400 $\mu$ m. À medida que foram contadas, as ilhotas foram aspiradas com uma pipeta de Pasteur, de vidro (#14672-200 VWR, Malboro, MA, EUA) e colocadas em uma placa de petri de 60x15 mm contendo solução salina balanceada de Hanks. Selecionaram-se duzentas ilhotas de Langerhans para cada transplante singênico e quatrocentas para cada transplante alogênico, sendo que, para cada experimento *in vitro*, variou-se o número total de ilhotas selecionadas. Cada compartimento de uma placa de 96 reservatórios recebeu aproximadamente 50 ilhotas em 200 $\mu$ l de meio de cultura.

### 3.4. PURIFICAÇÃO DO VETOR ADENOVIRAL (GRAHAM, PREVEC, 1991; HUTCHINS, 2002).

#### 3.4.1. Amplificação do vetor adenoviral

Ambos os tipos de adenovírus (GFP e survivina-GFP) foram amplificados utilizando-se a linhagem celular Human Embryonic Kidney (HEK)-293 (#CRL-1573 ATCC, Manassas, VA, EUA). Infectaram-se  $1.25 \times 10^8$  células em suspensão com  $3.75 \times 10^8$  unidades formadoras de infecção (UFI) do respectivo vetor viral. Os componentes foram, primeiramente, misturados em um frasco estéril em que se condicionaram 100 ml de meio de cultura DMEM (#10-017-CV, Mediatech Cellgro) contendo 10% de soro de bezerro inativado e 1% de penicilina-estreptomicina (#30-001-C1, Mediatech Cellgro). A mistura foi então distribuída em cinco frascos de cultura (Falcon #353025 BD) de 15 cm ( $2.5 \times 10^7$  células por frasco). Mantiveram-se as células em incubadora para tecidos (Incubadora Forma Scientific, Inc; Marietta, OH, EUA) a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> até que o efeito citopático se mostrasse evidente, o que se verificou geralmente após 2-4 dias de incubação. As mudanças morfológicas conhecidas como efeito citopático incluíram células infectadas, as quais se mantiveram intactas ou perderam o aspecto de estrela, arredondando-se e desprendendo-se do frasco de cultura, individualmente ou em forma de “cachos-de-uva”.

#### 3.4.2 Coleta do VETOR ADENOVIRAL

Utilizando-se uma pipeta estéril, todo o conteúdo dos frascos da cultura foi coletado diretamente em dois frascos cônicos de 250 ml (#430776 Corning, VWR) os quais foram centrifugados a 1500 x g por 5 min. Separaram-se quarenta e cinco ml do sobrenadante (1) de cada tubo que, em seguida, foram mantidos em temperatura de 4°C para uso posterior. Utilizaram-se os cinco ml restantes em cada tubo para se restabelecer a suspensão dos precipitados. As membranas das células foram então rompidas recorrendo-se a três ciclos consecutivos de congelamento e de degelo:



congelamento em banho de etanol-gelo seco; degelo mediante banho de água a 37°C. Após cada procedimento de degelo, misturaram-se as células com a utilização do agitador Vortex (MV1 Ikaworks Wilmington, NC, EUA). Após o terceiro ciclo, as células foram centrifugadas a 1500 x g, durante cinco minutos para precipitar todos os debris. Em seguida coletou-se o sobrenadante (2), e descartou-se o precipitado. Os sobrenadantes 1 e 2 foram então combinados e filtrados em sistema fechado a vácuo com filtro de 0.45µm no interior de aparelho de fluxo laminar provido de exaustor de segurança. A seguir, removeu-se o DNA celular contaminante com a adição de 40 µl de benzonase ao filtrado e procedeu-se à incubação a 37°C por exatos trinta minutos. A fim de se conferirem as propriedades ideais ao filtrado para o processo de purificação, adicionou-se, então, a esse mesmo filtrado, igual volume de solução-tampão para purificação viral (#PT3680-1 BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, EUA).

### 3.4.3 Purificação do vetor adenoviral

Para montagem do sistema de filtragem (#PT3680-1 BD Biosciences Clontech), posicionou-se o tubo aferente da seringa de 60 ml com válvula unidirecional dentro de um tubo cônico de 50 ml contendo 25 ml de solução tampão-fosfato (PBS #D8537, Sigma Corporation). O tampão foi, então, aspirado na seringa e passado através do filtro<sup>1</sup> com uma velocidade de 20 ml/min (gotas contáveis). Em seguida, dispôs-se o tubo aferente no interior do frasco contendo a solução viral, que foi aspirada para o interior da seringa e impulsionada, sucessivamente, através do filtro (20ml/min), e acondicionada em um recipiente específico para lixo contaminante, até que todo o conteúdo viral fosse filtrado. A seguir, introduziu-se o tubo aferente em um frasco contendo o tampão de lavagem, e 60 ml foram passados através do filtro com a mesma velocidade citada anteriormente (20ml/min). O filtro foi então desconectado da seringa, acoplado a uma seringa de 5 ml contendo 3 ml de tampão eluente. Transferiu-se um ml da solução eluente através do filtro para um tubo cônico estéril de 15 ml (#352097 BD, Falcon) e observou-se incubação, mantida a solução em temperatura

1 {Nota de rodapé - O filtro de purificação BD-Adeno-Xconsiste de vários filtros que se ligam seletivamente a partículas virais que passam através desse mesmo filtro. Esse sistema de filtros está contido em um pequeno cartucho cilíndrico, que lembra uma coluna de fluxo radial, e dispõe de portais de entrada e de saída para vedar o recipiente. Esse cartucho mede 3,5 cm de diâmetro e 1 cm de espessura}.

ambiente do sistema por um período de tempo de cinco minutos. O restante do eluente foi, então, passado através do filtro.

Trocou-se a solução eluente por tampão de formulação, uma vez que essa formulação contém um sal crioprotetor capaz de estabilizar a solução viral purificada (HOGANSON et al, 2002). Durante o processo de degelo, o referido tampão previne a agregação de partículas, mantém a isotonicidade e o pH. Realizou-se a troca por meio de centrifugações sucessivas em um filtro de concentração YM-50 (#42423 Millipore, Bedford, MA, EUA), dispondo esse mesmo filtro de uma membrana com alto teor de concentração de proteína com peso molecular limite de 50000 kDa. Quando o volume da solução viral purificada atingiu um ml, adicionaram-se 2-3 ml de tampão de formulação e submeteu-se o sistema a uma nova centrifugação. Após esse último passo, a solução viral final foi titulada e estocada em alíquotas de 10-50 µl em freezer de -80°C<sup>1</sup>.

#### 3.4.4 Titulação do Vetor Adenoviral (GRAHAM et al, 1977; ALLELO, 1979; PRICE, TURNER, CEPKO, 1987; EYKHOLT, MITCHELL, MARVIN, 2000).

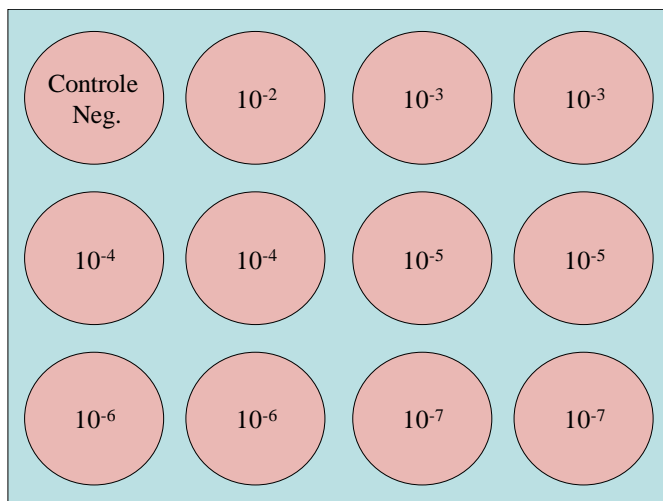
Para titulação viral, em cada reservatório de uma placa de cultura de doze reservatórios revestidos internamente por colágeno (#354500 BD), semearam-se  $5 \times 10^5$  células HEK-293 viáveis em suspensão de um ml de meio de cultura DMEM completo. Utilizando-se o mesmo meio de cultura como diluente, prepararam-se diluições logarítmicas de dez seriadas da amostra viral obtida pelo processo de purificação (TABELA 1).



TABELA 1 – DILUIÇÕES SERIADAS EM LOG DE 10 DA SOLUÇÃO ESTOQUE VIRAL PURIFICADA

	Vol. estoque viral	Vol. diluente	Diluição final
Diluição 1	10 µl (purificado)	990 µl	$10^{-2}$ ml
Diluição 2	100 µl Diluição 1	900 µl	$10^{-3}$ ml
Diluição 3	100 µl Diluição 2	900 µl	$10^{-4}$ ml
Diluição 4	100 µl Diluição 3	900 µl	$10^{-5}$ ml
Diluição 5	100 µl Diluição 4	900 µl	$10^{-6}$ ml
Diluição 6	100 µl Diluição 5	900 µl	$10^{-7}$ ml

Em seguida, adicionaram-se 100 µl das diluições virais em cada reservatório da placa de cultura, sempre em duplicata para melhorar a precisão da titulação (FIGURA 5).

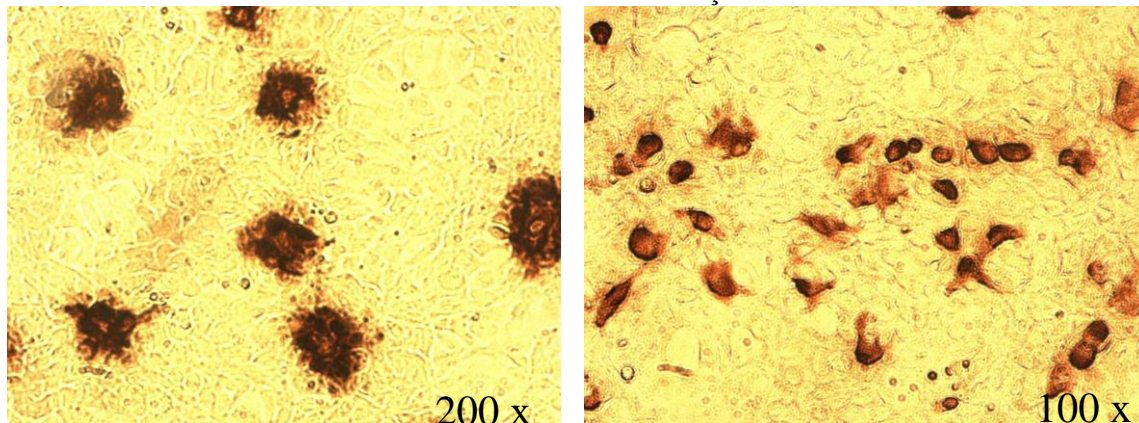
FIGURA 5 – TITULAÇÃO VIRAL APÓS PURIFICAÇÃO DO ADENOVÍRUS. DIAGRAMA REPRESENTATIVO DAS SOLUÇÕES VIRAIS DILUÍDAS, DISTRIBUÍDAS EM DUPLICATA, NA PLACA DE CULTURA CONTENDO  $5 \times 10^5$  CÉLULAS 293-HEK.

As células foram então incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> em incubadora, durante 48 horas. Ao final de dois dias de incubação, o meio de cultura foi aspirado cuidadosamente, e as células foram dessecadas no interior do exaustor de fluxo

laminar por cinco minutos. Na sequência, as células foram fixadas, mediante adição de um ml de metanol (#3024-10, Mallinck Rodt; Phillisburg, NJ, EUA), a -20°C em cada reservatório, vagarosamente, a fim de não destacar a camada celular do fundo do reservatório e, em procedimento seguinte, posicionadas no interior do freezer a -20°C por 10 min. Após a aspiração do metanol, os reservatórios foram lavados três vezes com um ml de PBS e 1% albumina sérica bovina-ABS (#A-3803, Fração V, Sigma). Foram então adicionados, em cada reservatório, 0,5 ml do anticorpo de camundongo anti-Hexon, diluído em 1:1000 em PBS + 1% ASB, com subsequente incubação de uma hora, a 37°C, em agitador orbital (Shelton Scientific, Peosta, IA, EUA). Decorridos sessenta minutos, o anticorpo foi aspirado e seguiram-se três lavagens com PBS + 1% ASB. Em cada reservatório, para se obter a imunodeteção secundária, recorreu-se à adição de 0,5ml de um anticorpo de rato anti-camundongo conjugado à peroxidase em diluição de 1:500 em + 1% ASB. Após novo ciclo de incubação e de lavagem, como anteriormente descrito, adicionaram-se 500µl de solução 3',3'-diaminobenzidina (DAB) diluída na proporção de 1:10 em solução-tampão de peroxidase em cada reservatório e observou-se incubação de 10 min em temperatura ambiente. Decorrida a fase de incubação, a solução de DAB foi drenada e 1 ml de PBS foi adicionado em cada reservatório, estando assim a placa de cultura pronta, em condições para a titulação do vírus purificado.

Para se quantificar o vírus, procedeu-se à contagem de pelo menos três campos visuais de células positivas pretas e/ou marrons, em microscópio óptico com lente de aumento 20X (Nikon TMS, Japan). Importante proceder à contagem apenas em reservatórios contendo 10% ou menos de células positivas – um campo visual ideal deve conter de 5 a 50 células positivas (FIGURA 6).

FIGURA 6 – ASPECTO DE DILUIÇÃO IDEAL PARA CONTAGEM DE CÉLULAS POSITIVAS (COLORAÇÃO MARROM-NEGRA) E TITULAÇÃO VIRAL. RESULTADO DE UMA DAS PURIFICAÇÕES VIRAIS DE PAD-SURVIVINA.



Após obtenção da média do número de células positivas em cada reservatório calculou-se o número de unidades formadoras de infecção (UFI) utilizando-se a seguinte fórmula matemática:

$$\frac{(\text{células infectadas/campo}) \times (\text{campos por reservatório})}{(\text{volume da solução viral – em ml}) \times (\text{fator de diluição})}$$

\* Derivação da área em campos/reservatório:

-raio de uma lente de aumento 20x padrão = 0.5mm

-área =  $\pi r^2$

-área de células contadas por campo visual =  $0.7853 \text{ mm}^2 = 7.853 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$

-área de um reservatório (para uma placa padrão de cultura BD falcon de 12 reservatórios =  $4.5 \text{ cm}^2$ ).

-campos/reservatório =  $4.5 \text{ cm}^2 / 7.853 \times 10^{-3} \text{ cm}^2 = 573 \text{ campos}$

\* Exemplo de cálculo:

-média de células positivas por campo visual = 10 na diluição de  $10^{-5}$

-campos/reservatório (lente de 20x) = 573

-volume da solução viral diluída adicionado = 0,1 ml

-UFI/ml =  $\frac{(10 \text{ células/campo}) \times (573 \text{ campos/reservatório})}{(0,1 \text{ ml}) \times (10^{-5}/\text{ml})} = 5.73 \times 10^9 \text{ UFI/ml}$

### 3.5 TRANSDUÇÃO DE ILHOTAS COM OS VETORES VIRAIS

Após isolamento, purificação e contagem, lavaram-se as ilhotas de Langerhans em solução de Hanks uma única vez. Na sequência, as ilhotas foram suspensas na

proporção de 50 ilhotas em 200 µl de meio de cultura CMRL 1066 (#99-603-CV Mediatech Cellgro) suplementada com soro de bezerro a 10%. Cada volume de 200 µl contendo 50 ilhotas foi então disposto em uma placa contendo 96 reservatórios. Inicialmente, diferentes doses do vetor viral foram testadas quanto à expressão da proteína survivina e citotoxicidade do vetor viral. De acordo com os resultados de *imunoblot* e da fluorescência, para todos os experimentos *in vitro* e *in vivo* escolheu-se a dose de  $2.5 \times 10^7$  UFI. Os vetores virais controle com apenas GFP ou com GFP-survivina foram adicionados diretamente aos reservatórios contendo as ilhotas. As placas de 96 reservatórios foram posicionadas em agitador orbital por cinco minutos, em temperatura ambiente, e colocadas em incubadora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por um período de 10-12 horas.

### 3.5.1 Análise da Fluorescência das Ilhotas Transduzidas com os Vetores Virais

Após transdução de 10-12 horas, as ilhotas foram visualizadas em microscópio invertido Nikon DIAPHOT 300 com filtro verde de fluorescência. Imagens foram obtidas utilizando-se uma câmera digital axial Zeiss e *software* de captura de imagens Openlab. Apenas grupos de 50 ilhotas com fluorescência verde, superior ou igual a 70%, foram utilizadas nos experimentos *in vitro* e *in vivo*.

## 3.6 WESTERN BLOT PARA DETECÇÃO DA PROTEÍNA SURVIVINA

### 3.6.1 Lise das Ilhotas para Obtenção de Proteína

Cerca de 200 ilhotas por grupo de tratamento (controle não transduzido, pAd-GFP e pAd-survivina-GFP) foram colocadas em tubos Eppendorf (#14231-062, VWR) de 1.5 ml e lavadas duas vezes com meio de cultura CMRL-1066 desprovido de soro de bezerro inativado, para subtração de proteína estranha que pudesse proporcionar reação cruzada durante a realização do *western blot*. As ilhotas foram então suspensas em 50 µl de solução de lise por hipóxia, misturadas vigorosamente por meio de vortex

e colocadas no gelo por uma hora. Na sequência, as amostras foram centrifugadas em microcentrífuga (Sorvall, Asheville, NC, EUA) a 13000 RPM, por trinta minutos, tendo, então, como sobrenadante, o lisado protéico a ser quantificado.

### 3.6.2 Ensaio de Bradford para Quantificação Protéica

Determinou-se a concentração protéica das amostras de ilhotas recorrendo-se ao método de BRADFORD, 1976. O experimento consiste na avaliação de uma curva padrão em que se comparam diferentes concentrações conhecidas de albumina bovina com amostras a serem utilizadas no *western blot*. Analisaram-se as proteínas controle e de teste utilizando-se cuvets para lâmpada ultravioleta, de comprimento de onda de 595 nanômetros, em espectrofotômetro (Beckman Coulter DU 640, Fullerton, CA, EUA). O esquema da curva-padrão está demonstrado na TABELA 2. A albumina bovina 10mg/ml (#B9001S, New England Biolabs, Beverly, MA, EUA) foi inicialmente diluída na proporção de 1:100 (10µl da solução estoque diluídos em 990 µl de água destilada) e preparada em concentrações gradativas em oito cuvets. Cada amostra de análise compôs-se de 799 µl de água destilada, 200 µl de reagente específico para proteína (#500-0006 Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) e 1 µl de DNA das ilhotas lisadas. Utilizou-se a primeira cuvete da curva padrão (sem proteína) para calibrar o espectrofotômetro. Após confecção da curva padrão, quantificaram-se as amostras uma a uma obtendo-se a concentração protéica em µg/µl. Para os experimentos de *western blot* utilizaram-se 50 µg de proteína total para cada amostra estudada.

TABELA 2 - CURVA PADRÃO DE REFERÊNCIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS DE PROTEÍNA

ÁGUA DESTILADA (µl)	800	790	780	750	720	700	650	600
ALBUMINA BOVINA 1:100 (µl)	0	10	20	50	80	100	150	200
REAGENTE ESPECÍFICO DE PROTEÍNA (µl)	200	200	200	200	200	200	200	200

### 3.6.3 Imunoblot

Cinquenta microgramas de proteína proveniente de cada amostra foram adicionadas à solução-tampão de *western blot* 5x e água destilada para um volume final de 30 µl. Como marcador de peso molecular, utilizaram-se 8 µl *rainbow marker* (#RPN-800V, Ambion, Cambridge, MA, EUA) adicionados também ao tampão de *western blot* e à água destilada. Todas as amostras, incluindo o marcador, foram levados à ebulição por cinco minutos. Logo em seguida, as amostras foram colocadas em gel de acrilamida a 4% e 15% e submetidas à eletroforese (Powerpac-HC, Bio-Rad, EUA) a 150V por 1 hora. Realizou-se a transferência das amostras utilizando-se membrana de nylon (Immobilon-P, Millipore Corp., Bedford, MA) a 60V, por 45 minutos. Após a transferência, imergiram-se as membranas em PBS contendo 5% de leite em pó, para bloqueio de proteínas inespecíficas, e, em seguida, durante uma hora, essas membranas foram colocadas em agitador orbital regulado em temperatura ambiente. Seccionaram-se então as membranas, aproximadamente no marcador de 30kb, em dois fragmentos, para aplicação em separado dos anticorpos primários. O anticorpo policlonal de coelho anti-survivina (#NB 500-201, Novus Biologicals, Littleton, CO, EUA) que reconhece a proteína survivina de peso molecular 16 kb foi diluído em PBS contendo 5% de leite em pó na proporção de 1:1000. Da mesma maneira diluiu-se o anticorpo de camundongo, antibetaactina (#NB600-501; Novus Biologicals), que detecta a proteína intrínseca de controle beta-actina (peso molecular-

37kb), na proporção de 1:5000. Procedeu-se à incubação de um dia para o outro em câmara fria (4°C) em agitador orbital. Na manhã seguinte, as membranas foram lavadas, sequencialmente, três vezes em PBS (2x5min e 1x15 minutos). Adicionaram-se os anticorpos secundários anticoelho e anticumundongo (#NIF824 e #NIF825, respectivamente, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA) às respectivas membranas em PBS contendo 5% de leite em pó na diluição de 1:5000. Seguiu-se agitação orbital em temperatura ambiente durante uma hora e, em seguida, submeteram-se as membranas à mais uma sequência de três ciclos de lavagem, semelhantes ao esquema descrito anteriormente. Passou-se, então, ao procedimento para se obter reação de quimioluminescência utilizando-se volumes idênticos de reagentes A e B (#RPN 210D1, Amersham Biosciences) misturados e aplicados imediatamente na superfície das membranas por um minuto. As membranas foram colocadas em placa de vidro, cobertas com plástico, como forma de prevenção contra a retenção de bolhas de ar em sua superfície e submetidas à exposição gradativa (iniciando-se com trinta segundos) em filme Hyperfilm® (Amersham Biosciences) no interior de câmara escura.

### 3.7 AVALIAÇÃO FUNCIONAL DAS ILHOTAS ISOLADAS

Para o estudo da secreção de insulina *in vitro*, em placa contendo 96 reservatórios (#353072, BD), distribuíram-se ilhotas isoladas que, em seguida, foram submetidas à transdução com os vetores virais pAd-GFP e pAd-survivina na dose de  $2.5 \times 10^7$  UFI como descrito anteriormente (3.5). Ilhotas não transduzidas foram utilizadas como controle. Após doze horas em incubadora a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>, dispuseram-se grupos de 50 ilhotas em filtros de nylon para, então, essas ilhotas serem perfundidas a 1ml/minuto, durante trinta minutos, com solução-tampão de bicarbonato Krebs-Ringer com 0.17g/dl de ABS contendo 3mM de glicose, para estabelecimento da secreção basal de insulina. A solução-tampão, bem como as ilhotas, foram mantidas a 37°C, 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>. Em uma segunda etapa, as ilhotas foram perfundidas com solução-tampão de Krebs contendo 20mM de glicose e 10μM de carbacol para

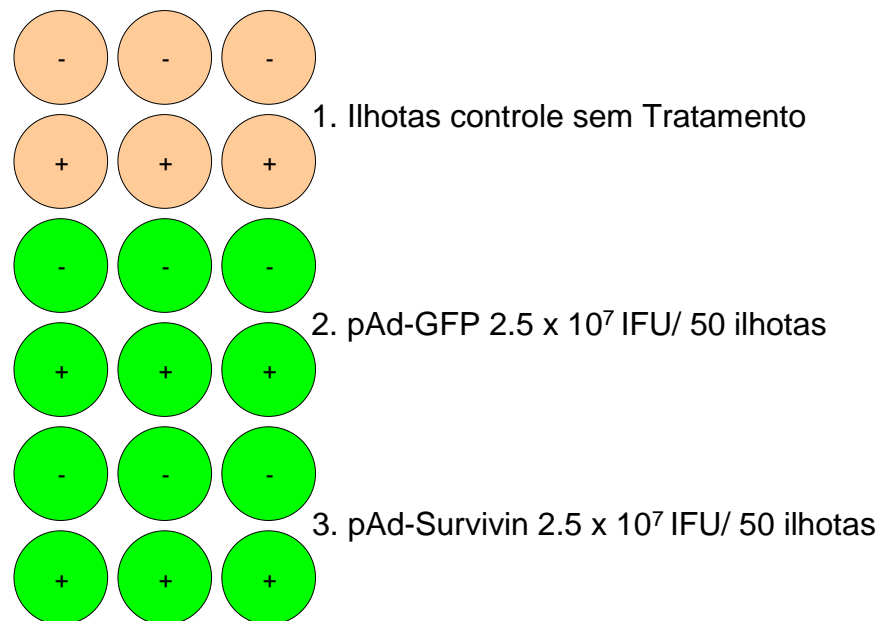
potencialização da liberação de insulina das células *beta*. A quantidade de insulina contida no meio foi quantificada por meio de radioimunoensaio utilizando-se insulina de rato como controle padrão, de acordo com os estudos prévios de GARCIA, HERMANS, HENQUIN, 1988; ZAWALICH, W.S.; ZAWALICH, K.C.; KELLEY, 1995.

### 3.8 AVALIAÇÃO DO ÍNDICE APOPTÓTICO POR MEIO DE COLORIMETRIA

Recorreu-se a uma solução neutra de sal de tetrazólio, o MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2,5-brometo difenil de tetrazólio – Sigma #M2128), como reagente principal do método colorimétrico quantitativo, para análise de proliferação e de sobrevivência de linhagens celulares de mamíferos em cultura. O método a seguir constitui uma adaptação do experimento original de MOSMANN, 1983, para utilização da colorimetria em ilhotas de Langerhans. Separaram-se trezentas ilhotas isoladas para cada grupo de tratamento (cada análise foi realizada com amostras triplicadas contendo 50 ilhotas) e divididas em seis reservatórios de uma placa de 96 reservatórios (FIGURA 7). As 50 ilhotas de cada meio foram suspensas em 200 µl de meio de cultura específico para ilhotas (CMRL com 10% de soro de bezerro e 1% de penicilina/estreptomicina) e mantidas em incubadora a 5% de CO<sub>2</sub> e a 37°C por 24 horas com  $2.5 \times 10^7$  UFI de pAd-GFP ou pAd-survivina, como descrito previamente (3.5). Como controle, utilizaram-se ilhotas mantidas em apenas meio de cultura, sem adição de vírus. Em seguida, o meio de cultura foi trocado por 200 µl de meio de cultura fresco, e um coquetel de citocinas foi adicionado à metade das trezentas ilhotas de cada amostra, utilizando-se as seguintes concentrações: interleucina beta (2ng/µl) – (#PM425B1, Pierce Endogen, Woburn, MA, EUA); fator de necrose tumoral alfa (2ng/100µl) – (##RRTNFI, Pierce Endogen); interferon gama (100U/ml) – (#RR200720, Pierce Endogen). Mantiveram-se as ilhotas em incubadora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 horas. Para o preparo do ensaio de citotoxicidade removeram-se 100 µl do meio de cultura, e 10 µl de solução de MTT (5mg/ml em tampão fosfato) foram adicionados em cada reservatório contendo ilhotas.



FIGURA 7 - ALOCAÇÃO DAS ILHOTAS DE ACORDO COM OS GRUPOS DE TRATAMENTO NUMA PLACA DE 96 RESERVATÓRIOS. NÚMERO TOTAL DE ILHOTAS POR GRUPO: 300; 50 POR RESERVATÓRIO; 150 COM ADIÇÃO DE CITOQUINAS(+) E 150 SEM(-).



Três reservatórios da placa, antes vazios, foram preenchidos com 100µl de meio de cultura fresco e mais 10µl de MTT, que funcionou como *background* na análise de colorimetria. A placa de 96 reservatórios foi novamente submetida a processo de incubação de quatro horas, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Logo após o período de incubação, acrescentaram-se 100µl de sulfóxido de dimetila (DMSO#D5879, Sigma Corporation) em cada reservatório, e a placa foi posicionada em agitador orbital, durante quinze minutos, para dissolução completa dos cristais que resultaram da reação. Procedeu-se à leitura da placa em leitor Beckman Coulter AD-340 (Fullerton, CA, EUA), no máximo até uma hora após a adição de DMSO, utilizando-se comprimento de onda de 570nm. Quanto maior o valor da leitura, maior o número de células viáveis. De cada leitura foram extraídas duas variáveis: a) número de células apoptóticas (subtraindo-se a absorbância dos reservatórios com adição de citocinas da

absorbância dos reservatórios sem tratamento) e b) índice apoptótico, utilizado no cálculo final, (dividindo-se o número de células apoptóticas pela absorbância dos reservatórios sem tratamento com citocinas). Os valores utilizados nos cálculos apontaram a média de cada amostra triplice.

### 3.9 TRANSPLANTE DE ILHOTAS DE LANGERHANS

#### 3.9.1 Camundongos Submetidos a Transplante de Ilhotas de Langerhans

Como doadores de ilhotas de Langerhans utilizaram-se camundongos C57BL/6b (modelo singênico marginal – 200 ilhotas) e camundongos BALB/c (modelo alogênico com enxerto ideal – 400 ilhotas e todos os experimentos *in vitro*). Elegeram-se, como receptores dos enxertos, camundongos C57BL/6 e camundongos NOD/*scid*. O delineamento experimental contendo os grupos de animais submetidos a transplante de ilhotas representa-se na TABELA 3.

#### 3.9.2 Indução de Diabetes Química

Induziu-se diabetes química mediante injeção endovenosa (veia caudal lateral) única de estreptozotocina (#S-0130, Sigma Corporation), em uma dose de 180 mg/kg diluída em 0,35 ml de solução salina isotônica, 10-15 dias antes da realização do transplante. Após sete dias, verificou-se a taxa de glicemia utilizando-se um glucômetro portátil Freestyle/Therasense (#11001, Alameda, CA, EUA). A coleta das amostras sanguíneas foi realizada por secção da porção distal da cauda dos animais. Selecionaram-se como receptores somente os animais que acusaram taxa de glicemia sérica igual ou superior a 350 mg/dl, obtido em duas verificações sucessivas, após uma semana da administração de estreptozotocina.

TABELA 3 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DOS GRUPOS QUE RECEBERAM ENXERTO DE ILHOTAS DE LANGERHANS. \* ENXERTO ALOGÊNICO QUE NÃO SOFRE REJEIÇÃO PELA DEFICIÊNCIA DE RESPOSTA DE LINFÓCITOS T E B NOS RECIPIENTES NOD/SCID.

GRUPO	N	RECEPTOR	TIPO DE ENXERTO	DOADOR	TRATAMENTO DO ENXERTO
1	4	C57Bl/6	Marginal singênico	C57Bl/6	nenhum
2	10	C57Bl/6	Marginal singênico	C57Bl/6	pAd-GFP
3	10	C57Bl/6	Marginal singênico	C57Bl/6	pAd-survivina
4	8	C57Bl/6	Ideal alogênico	BALB/c	nenhum
5	7	C57Bl/6	Ideal alogênico	BALB/c	pAd-GFP
6	10	C57Bl/6	Ideal alogênico	BALB/c	pAd-survivina
7	2	NOD/Scid	Ideal alogênico*	BALB/c	Nenhum
8	2	NOD/Scid	Ideal alogênico*	BALB/c	pAd-GFP
9	2	NOD/Scid	Ideal alogênico*	BALB/c	pAd-survivina

A constatação de hiperglicemia foi confirmada novamente no dia anterior ao transplante. Animais não transplantados até sete dias após a constatação inicial dos níveis hiperglicêmicos receberam, diariamente, insulina regular Novolin® 100U/ml (#183311 Novo Nordisk Pharmaceuticals, Princeton, NJ, EUA) 1:100, em solução salina isotônica 0,2 ml, via subcutânea.

### 3.9.3 Preparo do Enxerto de Ilhotas de Langerhans

As ilhotas de Langerhans, suspensas em solução salina balanceada de Hanks, foram aspiradas com uma seringa de Hamilton® (#1001, Hamilton Corporation, Reno, NV, EUA), previamente preenchida com 0,3 ml de solução salina balanceada de Hanks, tendo acoplada, em sua extremidade, uma pipeta de microaspiração (#4866, Corning Inc., Corning, NY, EUA). Manteve-se a seringa em posição vertical até que as ilhotas de Langerhans fossem posicionadas, por ação da gravidade, na extremidade da

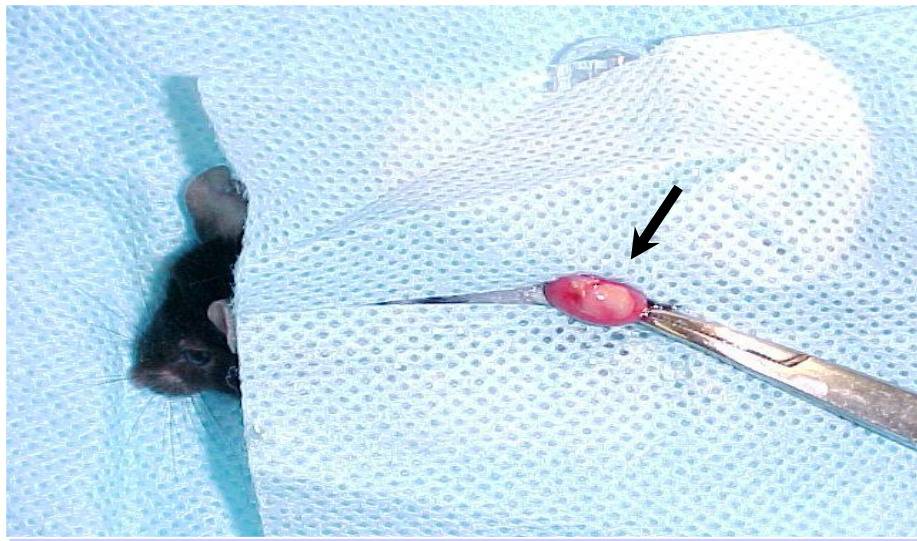
ponta da pipeta de microaspiração. Nessa extremidade acoplou-se um tubo de polietileno medindo 0,965 mm de diâmetro e 10 centímetros de comprimento (#427410, Intramedic<sup>®</sup>, BD), previamente infundido com etanol a 70% e solução salina balanceada de Hanks, alternadamente. Essa última solução permanecia no interior do tubo. As ilhotas de Langerhans foram injetadas no interior do tubo até o terço distal do seu comprimento. Nesse ponto, o tubo foi dobrado sobre si mesmo, ocluído com um pequeno pedaço de fita adesiva, desacoplado da seringa e centrifugado a 800 rotações por minuto durante quatro minutos. Preservou-se a extremidade ocluída voltada para baixo, com a finalidade de comprimir as ilhotas de Langerhans e facilitar a injeção, criando-se um *pellet* na extremidade do tubo dobrado. A seguir, conectou-se novamente à seringa o tubo contendo as ilhotas de Langerhans, evitando-se a entrada de ar no sistema. Dessa forma, as ilhotas de Langerhans foram posicionadas na extremidade distal do tubo.

#### 3.9.4 Transplante das Ilhotas de Langerhans no Receptor

Os receptores foram anestesiados com ketamina/xilestesina, conforme descrito previamente. Realizou-se tricotomia na região lombar esquerda e anti-sepsia com etanol a 70%, seguida de lombotomia esquerda com exposição do rim. Durante todo o procedimento, para evitar o ressecamento da cápsula, irrigou-se constantemente com solução salina balanceada de Hanks utilizando-se uma seringa de 10ml (#309604, BD). A seguir, abriu-se um pequeno orifício na cápsula renal com a agulha de 30G 1/2 (#305106, BD). A ponta do tubo de polietileno, conectado à seringa de Hamilton<sup>®</sup>, contendo as ilhotas de Langerhans centrifugadas, foi introduzida, pelo orifício da cápsula, na loja renal, de maneira a confeccionar, nessa mesma loja renal, uma pequena cavidade. A seguir, as ilhotas de Langerhans foram lentamente injetadas na loja subcapsular renal. O tubo foi retirado, e o rim novamente irrigado. O orifício criado na cápsula renal foi cauterizado com cautério oftálmico de baixa temperatura (#AA00, Aaron Medical, St. Petesburg, FL, EUA), e as ilhotas de Langerhans foram cuidadosamente espalhadas em camada única na loja renal subcapsular (FIGURA 8).

Novamente introduziu-se o rim na cavidade abdominal, e a parede abdominal foi suturada com pontos separados utilizando-se monocryl 5-0 (#Y493G, Ethicon, Sommerville, NJ, EUA).

FIGURA 8 – ASPECTO DE UM ENXERTO IDEAL DE 400 ILHOTAS DE LANGERHANS, APÓS INJEÇÃO NA LOJA SUBCAPSULAR RENAL ESQUERDA



### 3.9.5 Nefrectomia em Receptores dos Transplantes de Ilhotas de Langerhans

No quinquagésimo dia de pós-operatório, alguns receptores do enxerto singênico foram submetidos à nefrectomia esquerda. Nesses camundongos, no quinto dia após a nefrectomia verificou-se a taxa de glicemia para comprovação da dependência do enxerto de ilhotas funcionantes por parte do recipiente diabético. Assim, considerou-se taxa de glicemia maior que 250 mg/dl como indicativa de funcionamento prévio do enxerto. Após essa confirmação, os camundongos foram mortos. No quarto dia de pós-operatório, submeteram-se à nefrectomia esquerda dois receptores de ilhotas singênicas com enxerto funcionante de cada grupo. Posicionaram-se os animais em decúbito dorsal sob anestesia. Realizou-se uma incisão abdominal mediana, com exposição da cavidade abdominal. O rim esquerdo contendo o enxerto foi isolado, e o pedículo vascular foi ligado com fio de algodão 4-0 (#A303, Ethicon) e, em seguida, seccionado. Seguiu-se então o fechamento da cavidade em

dois planos utilizando-se monocryl 5-0 (Ethicon®).

### 3.9.6 Cuidados Pós-operatórios

No período pós-operatório os animais foram mantidos em gaiolas individuais no Biotério da Universidade de Massachusetts, em sala mantida com temperatura ambiente entre 18 e 22°C e ciclo dia-noite controlado com parâmetro de doze horas.

Durante as primeiras doze horas após a operação (transplantes de ilhotas de Langerhans e nefrectomias), os animais receberam buprenorfina (#7571, Reckitt Pharmaceuticals, Richmond, VA, EUA) na dose de 2mg/kg de peso, de 6/6 horas, por via subcutânea, e ração para roedores (Labdiet®, PMI Nutrition International Incorporation, Brentwood, MO, EUA) moída e úmida. Após esse período, os animais foram mantidos com ração e água *ad libitum*.

### 3.9.7 Avaliação da Glicemia no Pós-operatório

Verificou-se a taxa de glicemia dos animais utilizando-se glucômetro no 1º, 5º e 10º dia de pós-operatório e, depois, a cada dez dias durante cinquenta dias, nos grupos singênicos e nos grupos de receptores NOD/*scid*. Nos grupos de transplante alogênicos, os níveis de glicose sanguínea foram determinados no 1º, 3º, 5º e 7º dia de pós-operatório e, depois, em dias alternados até acusarem rejeição. Nível glicêmico abaixo de 200mg/dl na primeira semana após o transplante significou reversão do diabetes químico. Glicemia acima de 200mg/dl até o sétimo dia de pós-operatório foi considerada taxa indicativa de não-funcionamento primário do enxerto. Glicemia acima de 250 mg/dl após reversão inicial do diabetes sinalizou rejeição do enxerto. Após 24 horas da primeira medição de glicose sérica acima de 250mg/dl, a glicemia foi novamente determinada, para confirmação do diagnóstico de rejeição. Camundongos com rejeição aguda do enxerto foram mortos e aqueles com não-funcionamento primário do enxerto foram, além de mortos, excluídos do estudo.

### 3.9.8 Avaliação do Peso em Camundongos NOD/*scid*

Em receptores NOD/Scid procedeu-se ao acompanhamento do peso em gramas, iniciando-se a avaliação no pré-operatório imediato, semanalmente, até a morte do animal no quinquagésimo dia pós-transplante. Utilizou-se balança Ohaus CS-200 (Ohaus Corporation, China).

## 3.10 ESTUDO DA INCIDÊNCIA DE DIABETES EM CAMUNDONGOS NOD

### 3.10.1 Construção de Camundongos NOD/LtJ Transgênicos para Survivina.

A construção de camundongos NOD/Ltj transgênicos para survivina foi realizada na divisão de engenharia genética do Laboratório Jakson em Maine, EUA. Uma extensão completa de cDNA de survivina proveniente de camundongo foi clonado nas localizações *HindIII* e *KpnI* no segmento descendente do promotor de insulina murina (RIP- gentilmente oferecida pelo Dr. Sherwin, da escola de medicina de YALE), contendo seqüências SV40 em sua extremidade 3'. O *construct* (RIP-SVV) foi confirmado por análise de seqüência de DNA, purificado por cromatografia de troca de íons e microinjetados (5ng/ml) em embriões de NOD/Ltj que forma implantados em fêmeas NOD/Ltj pseudográvidas como descrito por GROSSMAN *et al*, 2000.

### 3.10.2 Protocolo de Cruzamento para Camundongos NOD/Ltj “wild type- WT” e Camundongos NOD/LtJ Tgn-Survivina.

Colocaram-se em gaiolas camundongos dessas duas cepas, NOD WT e NOD Tgn-survivina, com idade entre oito semanas e seis meses, na proporção de duas fêmeas por um macho, durante um período de 2-4 semanas. Cruzaram-se entre si camundongos WT para manutenção da colônia WT; camundongos transgênicos para survivina cruzaram-se apenas com camundongos WT pelo fato de o cruzamento entre

transgênicos acusar uma expressiva taxa de mortalidade da progênie. Após esse período, verificaram-se as fêmeas e, em grupos cujas fêmeas não se mostraram prenhas, os machos e/ou fêmeas foram remanejados. As fêmeas prenhas foram colocadas em gaiolas individuais para se evitar estresse durante e após o parto. Fêmeas prenhas que apresentavam poliúria e níveis de glicemia acima de 250mg/dl foram mortas e excluídas do estudo. Desmamaram-se as progênes na idade de quatro semanas, sendo as fêmeas acompanhadas para verificação de incidência de diabetes, e usadas para estudo histológico.

### 3.10.3 Isolamento de DNA Total das Progênes de Camundongos NOD/LTJ Tgn para Survivina

Identificou-se, na orelha esquerda, com uma placa de alumínio contendo um número, cada camundongo integrante de progênes provenientes de progenitor(a) Tgn para survivina. Cerca de 0.4 cm da porção terminal da cauda desses camundongos foi seccionada e colocada em imersão de 180µl, utilizando-se tampão especial de digestão tecidual (#69504, Qiagen, Maryland, EUA) e 20µl de proteinase K em tubos de Eppendorf (#14231-062, VWR). Os componentes foram submetidos à agitação vigorosa no agitador vortex e incubados a 55°C de um dia para o outro. No dia seguinte, o conteúdo dos tubos foi misturado por vortex durante quinze segundos e recebeu adição de 400µl de solução alcoólica tamponada (#69504, Qiagen). O conteúdo foi então transferido para uma coluna *Mini Spin Dneasy* (#69504, Qiagen) introduzida em um tubo coletor de 2 ml, sendo o conjunto centrifugado a 8000 rpm, por um minuto, em microcentrífuga. A seguir, o filtrado foi descartado e a coluna foi submetida a duas lavagens sucessivas com solução de lavagem específica, obedecendo aos mesmos padrões de centrifugação descritos anteriormente. Uma centrifugação adicional de três minutos a 14000 rpm foi realizada com o intuito de se proceder à secagem completa da membrana de afinidade da coluna. Após ser transferida para um novo tubo coletor, cada coluna recebeu a adição de 200µl de solução eluente diretamente na membrana de afinidade. Observou-se procedimento de um minuto de



incubação em temperatura ambiente e centrifugação do sistema a 6000 rpm por um minuto, sendo o filtrado constituído de DNA total, isolado da cauda dos camundongos.

#### 3.10.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para Identificação de Camundongos NOD/Ltj transgênicos para Survivina.

Dois µl de DNA total isolado foram utilizados em cada amostra de amplificação do DNA mediante reação em cadeia da polimerase (PCR).

As seqüências dos *primers* customizados utilizados na PCR (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) foram:

Forward 5' TTCCTTCTACCTCTGAGGGTG 3'

Reverse 5' TCGAGGTCTGACTCAGCATTAG 3'

Tamanho do produto da PCR: 1117 bp

Os reagentes utilizados em cada tubo de PCR (#PCR-0208C, Axygen, Union City, CA, EUA) encontram-se descritos na TABELA 4. Colocaram-se todos os tubos contendo os reagentes em termociclador Eppendorf (Mastercycler, Westbury, NY, EUA). Como controle positivo utilizou-se DNA recombinante de survivina, e, como negativo, apenas água bidestilada.

Ambos os controles foram submetidos à reação de amplificação em paralelo às amostras. As condições otimizadas para a reação de amplificação encontram-se representadas na TABELA 5. Ao término da reação, colocaram-se as amostras no refrigerador, a 4°C, até o momento de serem analisadas por um período não superior a uma semana.

TABELA 4 - COMPONENTES DE CADA AMOSTRA DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA POR PCR. (REAGENTES PROVENIENTES DE INVITROGEN)

COMPONENTE	VOLUME (µl)
DNA total	2
Primer Forward 10µM	5
Primer Reverse 10 µM	5
Tampão de PCR 10x (#1193202)	5
Cloreto de magnésio 50nM (#118409)	1.5
Enzima TAQ polimerase (#11304-011)	1
Mistura DNTTP (#1233573)	2
Água bidestilada	8.5
Total	30

Dez microlitros de cada amostra foram adicionados a 2 µl de tampão corante 6X em um tubo adicional. A mistura foi colocada em meios individuais de um gel de agarose (#2125, Omnipur, Darmstadt, Alemanha) a 1%, imerso em tampão de eletroforese para PCR (TAE), em cassete próprio. O conjunto foi, então, submetido a corrente de 100 V por, um intervalo de uma hora. Como corante, utilizou-se o SYBR-Green (#S7567, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). O gel foi imerso em corante Sybr-green diluído na proporção de 1:10.000 e colocado em agitador orbital por trinta minutos, protegido da luz por papel alumínio. Imediatamente após a agitação, o gel foi colocado em um transiluminador de luz ultravioleta (UV) (Spectroline, Spectronics Corporation, Westbury, NY, EUA), e as bandas correspondentes à sequência pré-determinada pelos *primers* foram identificadas nas amostras pertencentes aos camundongos transgênicos. Utilizando-se uma câmera Polaróide GelCam (Polaroid, UK ) obtiveram-se fotografias para documentação dos achados.

TABELA 5 - CONDIÇÕES OTIMIZADAS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA AMPLIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE BASES CORRESPONDENTES AO GENE SURVIVINA.

CICLO	TEMPERATURA	DURAÇÃO (min)	REPETIÇÃO
ANELAMENTO	58°C	-	-
1	95°C	7	1
2	95°C	1	40
	58°C	1	
	72°C	1	
3	72°C	10	1

### 3.10.5 Controle da incidência de diabetes em camundongos NOD/LTJ

Durante o período compreendido entre 10 e 25 semanas de idade camundongos NOD/LTJ WT e Tgn para survivina foram testados uma vez por semana com relação à presença de glicosúria utilizando-se fitas Keto-Diastix® (#2882, Bayer, Elkhart, IN, EUA). Com resultado positivo, confirmava-se a hiperglicemia, como previamente descrito, utilizando-se glicômetro Therasense. Duas medições consecutivas de níveis glicêmicos acima de 250mg/dl foram confirmatórias para o diagnóstico de *diabetes mellitus*.

## 3.11 HISTOLOGIA

### 3.11.1 Imunoistoquímica para Detecção de Survivina

Para imunoistoquímica de ilhotas individuais transduzidas com os vetores virais e avaliação da expressão de survivina, cerca de 50-100 ilhotas isoladas foram dispersas em gel de agarose (Omnipur) a 1%, solidificadas e embebidas em parafina. Enxertos de ilhotas singênicos foram ressecados no quarto e no quinquagésimo dias após o transplante e embebidos da mesma forma em parafina. Secções de quatro µm foram efetuadas, e as lâminas colocadas em forno a 60°C por doze horas. Os cortes foram deparafinizados em solução de xileno por cinco horas e lavados duas vezes em etanol. Anulou-se a atividade endógena da peroxidase colocando-se as lâminas em solução de metanol contendo peróxido de hidrogênio (#325-500, Fisher Chemicals, Fair Lawn, NJ, EUA) a 3% durante dez minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas sequencialmente em etanol e água e colocadas em panela de pressão (Wear-Ever Mirro Co., Manitowoc, WI, EUA) contendo 1.5 litros de citrato de sódio 9mM de pH 6.0 e aquecidas até o ponto de ebulição para recuperação do antígeno. A tampa foi então colocada e, após seis minutos, a válvula de pressão foi aberta. Cuidadosamente, resfriaram-se as lâminas em água mantida em temperatura ambiente, lavadas três vezes

em água destilada e um vez em PBS de pH 7.0. As lâminas foram colocadas em papel toalha umedecido e dispostas sobre uma bandeja coberta. Aplicou-se o anticorpo primário policlonal de coelho anti-survivina (#NB 500-201; Novus Biologicals) sobre as lâminas na concentração de 0.5µg/ml diluído em solução diluente de anticorpo (#00-3118 Zymed, San Francisco, CA, EUA), e essas lâminas foram incubadas em sala aclimatada a 4°C de um dia para o outro. Como controle negativo, utilizou-se anticorpo isotípico anticumundongo IgG1 diluído nas mesmas condições. Efetuou-se a coloração das lâminas utilizando-se Histostatin-Plus (#85-9243, Zymed, San Francisco, CA, EUA) com DAB como cromogênio, de acordo com as instruções da companhia. As lâminas foram lavadas duas vezes em água destilada, coradas secundariamente com hematoxilina de Harris (#GHS-380, Sigma Corporation), lavadas uma vez mais em água destilada e, então, cobertas com microlâminas. As secções foram visualizadas em microscópio óptico da marca Nikon (TMS, Japão).

### 3.11.2 Imunofluorescência Indireta para Detecção de Survivina

Como a microscopia de fluorescência efetuada em ilhotas em cultura fornece apenas imagens bidimensionais, estudos mais detalhados se fizeram necessários para caracterizar o poder de penetração do vetor viral. Um deles foi a realização de imunistoquímica em ilhotas individualizadas com um anticorpo anti-survivina conjugado ao fluorocromo FITC (verde). Para imunofluorescência de ilhotas individuais transduzidas com os vetores virais (não acoplados à proteína fluorescente verde-GFP) e avaliação da expressão de survivina, cerca de 50-100 ilhotas isoladas foram dispersas em gel de agarose (Omnipur) a 1%, solidificadas e embebidas em parafina. As lâminas foram processadas, como descrito previamente, até o fim da incubação, com o anticorpo primário policlonal de coelho anti-survivina (#NB 500-201; Novus Biologicals). Para detecção, foi então utilizado anticorpo secundário anti-IgG de coelho, conjugado ao fluorocromo FITC (# NB-730-F, Novus Biologicals) na diluição de 1:1000 por uma hora em sala a 4°C, protegida contra luminosidade. Para análise das lâminas, utilizou-se o microscópio invertido Nikon DIAPHOT 300, com

filtro verde de fluorescência. Imagens foram obtidas conforme previamente já se descreveu.

### 3.11.3 Avaliação de Apoptose Mediante Coloração Específica para Núcleos Celulares

Para simular as condições das ilhotas transplantadas, antes de a neovascularização ocorrer, transduziram-se ilhotas isoladas e dispostas em placa de 96 reservatórios com pAd-GFP ou pAd-survivina. Após cultura de um dia para o outro, as ilhotas foram lavadas três vezes consecutivas em meio de cultura CMRL e incubadas a 37°C em uma câmara anaeróbica, com teor de oxigênio menor do que 0.5% e ausência de soro de bezerro inativado como fonte de energia. Após doze horas, dispuseram-se novamente as ilhotas em meio de cultura completo, em atmosfera humidificada, com teor de CO<sub>2</sub> a 37°C, por uma hora. Seguiu-se então dissociação da cápsula das ilhotas e obtenção de suspensão de células individuais utilizando-se tripsina-EDTA 0.25% (#25200-056, Gibco, Invitrogen Corp.) 50µl/50 ilhotas e pipetagem sucessiva durante cinco minutos. A suspensão de células individuais foi então submetida ao processo de citocentrifugação em lâminas de vidro. Rapidamente mergulharam-se as lâminas em PBS. Aproximadamente 300µl de solução de 4',6-diamidino- 2-phenylindole, dhydrochloride FluoroPure (DAPI, #D21490, Molecular Probes, Invitrogen) de concentração 300nM diluída em PBS foram aplicados sobre toda a extensão da lâmina. Seguiu-se período de incubação de cinco minutos, lavagem exaustiva com PBS e cobertura da lâmina com Prolong Antifade (#P7481) e lamínula de vidro. A percentagem de núcleos fragmentados, um dos sinais diretos de apoptose, foi quantificada utilizando-se o microscópio invertido Nikon DIAPHOT 300 com filtro verde de fluorescência. Imagens foram obtidas conforme previamente descrito.

#### 3.11.4 Estudo Histológico com Coloração de Hematoxilina-Eosina em Pâncreas de Camundongos NOD Ltj e NOD Tgn para Survivina.

Camundongos NOD Ltj e NOD Ltj Tgn para survivina foram mortos com doze semanas de idade e tiveram o respectivo pâncreas retirado e fixado em formalina a 10% e emblocados em parafina. Cortes seriados de 4  $\mu$ m foram corados com hematoxilina e eosina. Paralelamente, procedeu-se à imunoistoquímica para detecção de survivina utilizando-se técnica descrita previamente em 3.12.1 adaptada para tecido pancreático.

### 3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para todos os experimentos *in vitro* utilizou-se o teste t de Student como meio de comparação dois a dois entre médias dos grupos de tratamento e de controle. Para comparação dos testes de tolerância à glicose intraperitoneal utilizou-se igualmente o teste t de Student. Avaliaram-se as diferenças entre os valores de glicose sérica pós-transplante nos grupos de camundongos receptores de massa marginal singênica de ilhotas utilizando-se o teste ANOVA para medidas repetidas (modelos misturados) por máxima probabilidade com auxílio do programa estatístico SAS Proc Mixed statistical de MACLEAN, SANDERS, STROUP, 1991.

Estabeleceu-se comparação dois a dois dos grupos de animais submetidos a transplante de ilhotas de Langerhans em relação à variável tempo de sobrevida dos enxertos alogênicos, utilizando-se o teste não-paramétrico *log-rank*. Em todos os testes considerou-se o nível de significância de 5% ( $p \leq 0.05$ ).

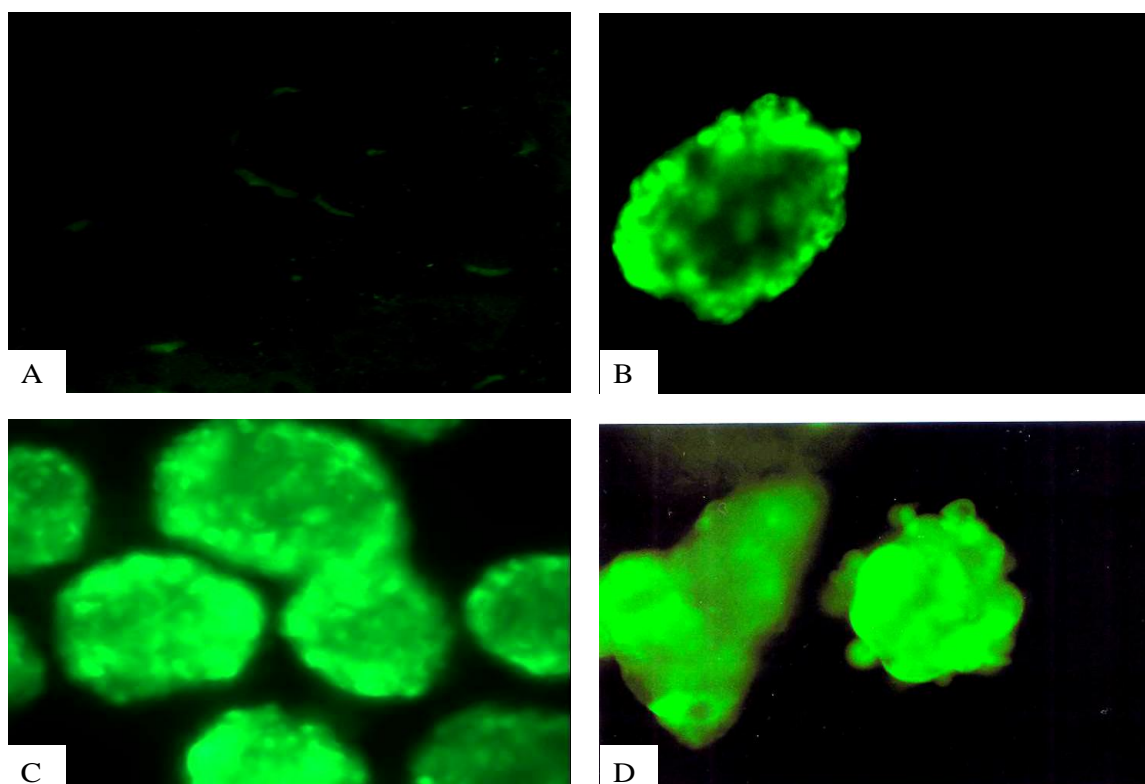


## 4 RESULTADOS

### 4.1 TRANSDUÇÃO DE ILHOTAS DE LANGERHANS COM pAd-GFP-SURVIVINA

A transdução de ilhotas isoladas utilizando-se diferentes concentrações do vetor viral resultou em aumentada reatividade da proteína fluorescente verde. A ausência do vetor viral nos experimentos com ilhotas em cultura registra presença mínima da fluorescência verde (FIGURA 9A).

FIGURA 9 - EXPRESSÃO DA PROTEÍNA FLUORESCENTE VERDE (GFP) EM ILHOTAS DE LANGERHANS: A- AUSÊNCIA DE VETOR VIRAL; B- PAD-SURVIVINA  $5 \times 10^6$  UFI; C- PAD-SURVIVINA  $1 \times 10^7$  UFI; D- PAD-SURVIVINA  $2.5 \times 10^7$  UFI. (200X)

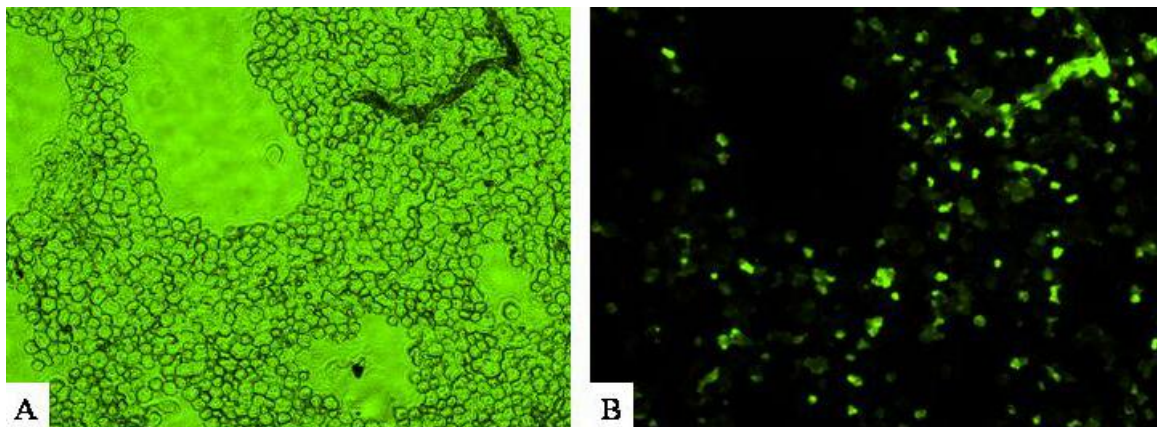


Em contraste, concentrações crescentes de vírus no meio de cultura foram diretamente proporcionais ao aumento da fluorescência verde (FIGURA 9C-D). Concentrações superiores a  $3 \times 10^7$  UFI, por um período doze horas, ou concentração de  $1-2,5 \times 10^7$  UFI por período superior a dezesseis horas foram associadas tanto à



granulação da cápsula das ilhotas quanto à morte celular. Em um experimento semelhante, submeteram-se ilhotas transduzidas à lise de suas cápsulas com resultante suspensão em células individuais e estimativa do número de células infectadas pelo vetor viral (FIGURA 10). Utilizando-se o software *Openlab* conseguiu-se um resultado que demonstra que 70% das células em suspensão manifestam alguma fluorescência, sendo então, submetidas ao processo de transdução efetivamente com a presença do vírus.

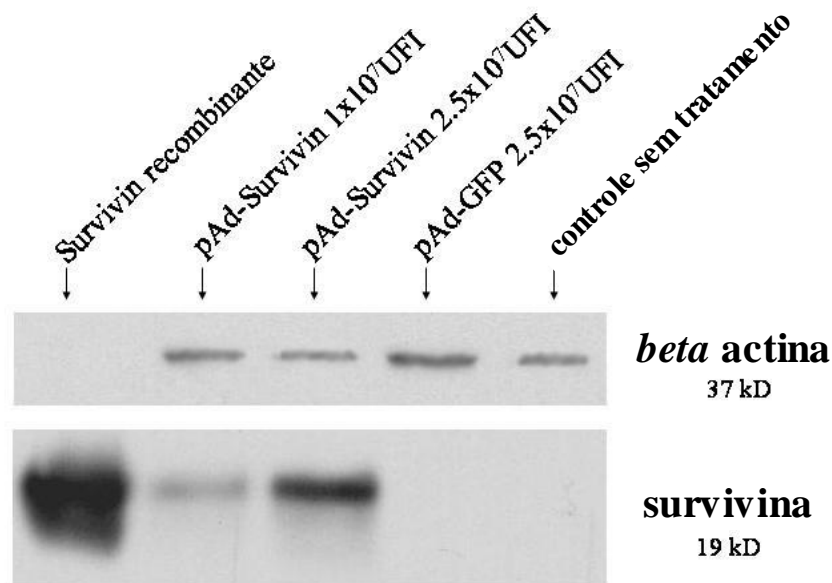
FIGURA 10 - IMAGEM DE CÉLULAS DISSOCIADAS DE ILHOTAS TRANSDUZIDAS COM PAD-SURVIVINA-GFP APÓS CITOCENTRIFUGAÇÃO. APROXIMADAMENTE 70% DAS CÉLULAS EM SUSPENSÃO APRESENTAM FLUORESCÊNCIA VERDE, COMPROVANDO, EFETIVAMENTE A TRANSDUÇÃO COM O VETOR VIRAL. A FOTOMICROGRAFIA B DESTACA A IMAGEM ANTERIOR VISUALIZADA COM FILTRO PARA FLUORESCÊNCIA VERDE (400X).



#### 4.2 TESTE *WESTERN BLOT* PARA DETECÇÃO DA PROTEÍNA SURVIVINA

Semelhantemente ao resultado de dependência à dose de vetor viral que se demonstrou mediante expressão da fluorescência verde, incrementos na concentração de vetor viral com survivina e GFP resultaram em uma maior expressão da proteína survivina analisada recorrendo-se ao teste *western blot* (FIGURA 11). Bandas evidentes na região de peso molecular 19 kDa evidenciaram-se em ambas as concentrações de survivina testadas, bem como na amostra de survivina recombinante (controle positivo). Em contrapartida, o teste de *imunoblot* de lisado de ilhotas submetidas à cultura na presença de vetor viral com GFP apenas ou de ilhotas incubadas sem vetor viral não detectou expressão do gene survivina. Quantidades equivalentes de proteína para cada amostra foram submetidas à análise por *western blot*, como evidencia a expressão da proteína intrínseca controle beta-actina presente em todos os tecidos de mamíferos.

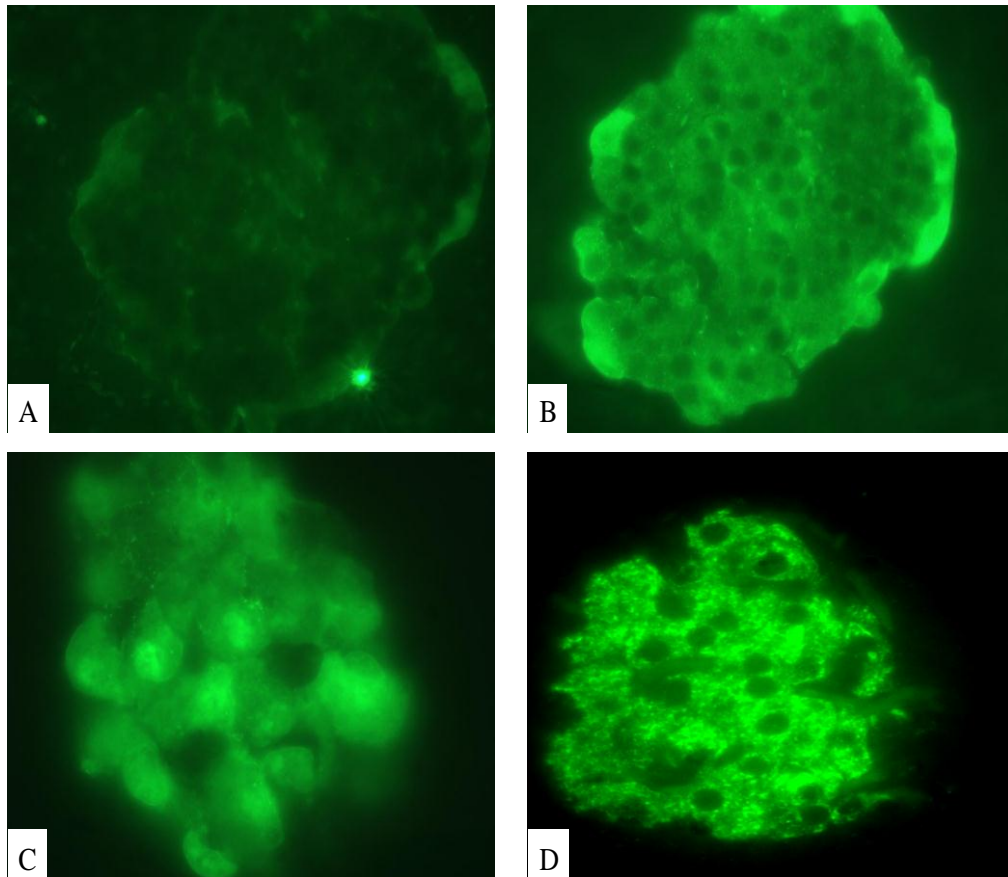
FIGURA 11 - TESTE *WESTERN BLOT* EM LISADO DE ILHOTAS PARA DETECÇÃO DA PROTEÍNA SURVIVINA. APÓS CULTURA DE DOZE HORAS, ILHOTAS SEM TRATAMENTO (GRUPO CONTROLE); TRATADAS COM DUAS CONCENTRAÇÕES VIRAIS DIFERENTES DE PAD-SURVIVINA ( $1 \times 10^7$  UFI E  $2.5 \times 10^7$  UFI); TRATADAS COM PAD-GFP NA CONCENTRAÇÃO DE  $2.5 \times 10^7$  UFI FORAM LISADAS E ANALISADAS POR *IMUNOBLOT*. DNA RECOMBINANTE DE SURVIVINA FOI UTILIZADO COMO CONTROLE POSITIVO. UM DENTRE CINCO EXPERIMENTOS ESTÁ REPRESENTADO NA FIGURA.



#### 4.3 IMMUNOISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE SURVIVINA EM ILHOTAS ISOLADAS

Ilhotas foram embebidas em agarose e, em seguida, processadas em parafina para cortes randômicos e análise da presença de survivina. A utilização de número de UFI inferior à  $2 \times 10^7$  do vetor viral carreando o gene survivina foi associada à uma penetração na periferia das ilhotas apenas. Na concentração  $2.5 \times 10^7$  UFI, a expressão de survivina pode ser observada em todas as regiões de uma ilhota (FIGURA 12), enquanto ilhotas controle apresentaram ausência completa de fluorescência verde.

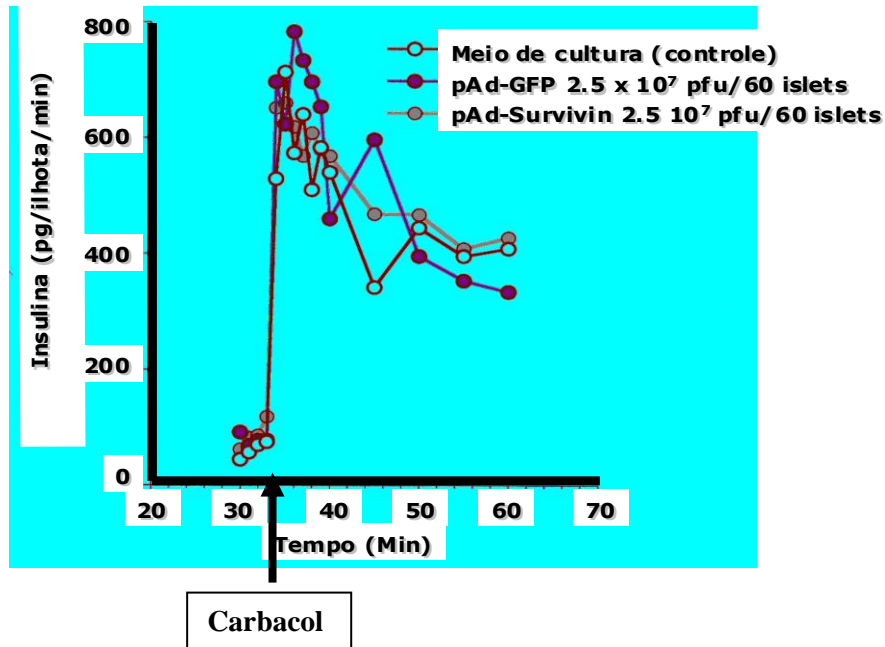
FIGURA 12- EXPRESSÃO DA PROTEÍNA SURVIVINA POR IMUNOISTOQUÍMICA. SEM ADIÇÃO DE VETOR VIRAL-A; COM PAD-SURVIVINA  $5 \times 10^6$  UFI-B;  $1 \times 10^7$  UFI-C E  $2.5 \times 10^7$  UFI-D. UM ANTICORPO SECUNDÁRIO ANTI-SURVIVINA CONJUGADO AO FLUOROCROMO FITC FOI UTILIZADO(400X).



#### 4.4 AVALIAÇÃO FUNCIONAL DAS ILHOTAS *IN VITRO* POR MEIO DE RADIOIMUNOENSAIO

Conforme o gráfico de secreção de insulina (GRÁFICO 1), não se verificou diferença significativa na liberação de insulina pelas ilhotas antes e após o estímulo com carbacol, considerando-se todos os grupos de tratamento. O vetor viral utilizado nos experimentos, associado ou não ao gene survivina, não alterou o padrão secretório das ilhotas de Langerhans *in vitro*.

GRÁFICO 1 - PADRÃO SECRETÓRIO DE INSULINA EM ILHOTAS TRANSDUZIDAS COM SURVIVINA. (ENSAIO ELISA)

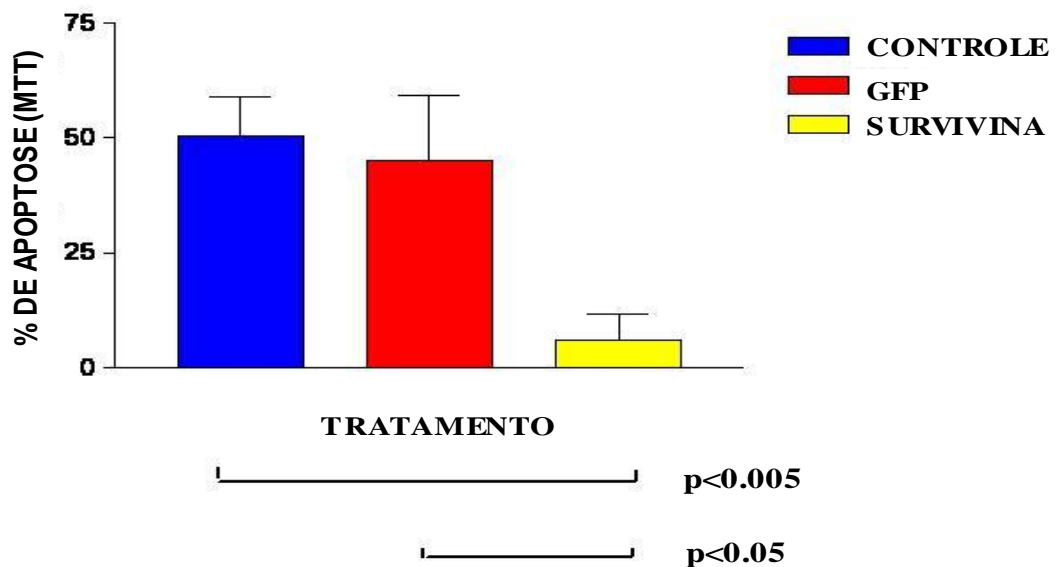


#### 4.5 ÍNDICE APOPTÓTICO DE ILHOTAS AVALIADO MEDIANTE COLORIMETRIA

Quando se submeteu o grupo controle transduzido com pAd-GFP ao coquetel de citocinas composto por interleucina beta, fator de necrose tumoral alfa e interferon gama durante 72 horas, 50% das ilhotas sofreram apoptose, determinada pela perda da função mitocondrial verificada no teste de colorimetria. Ilhotas transduzidas com o vetor viral apenas apresentaram semelhante índice de apoptose (44%). Em contrapartida, a expressão de survivina exerceu efeito citoprotetor, como demonstram os resultados obtidos, em que apenas 5.9% das ilhotas se tornaram apoptóticas após

insulto citotóxico prolongado ( $p < 0.05$  em comparação com ambos os grupos controle: sem tratamento e pAd-GFP). (GRÁFICO 2)

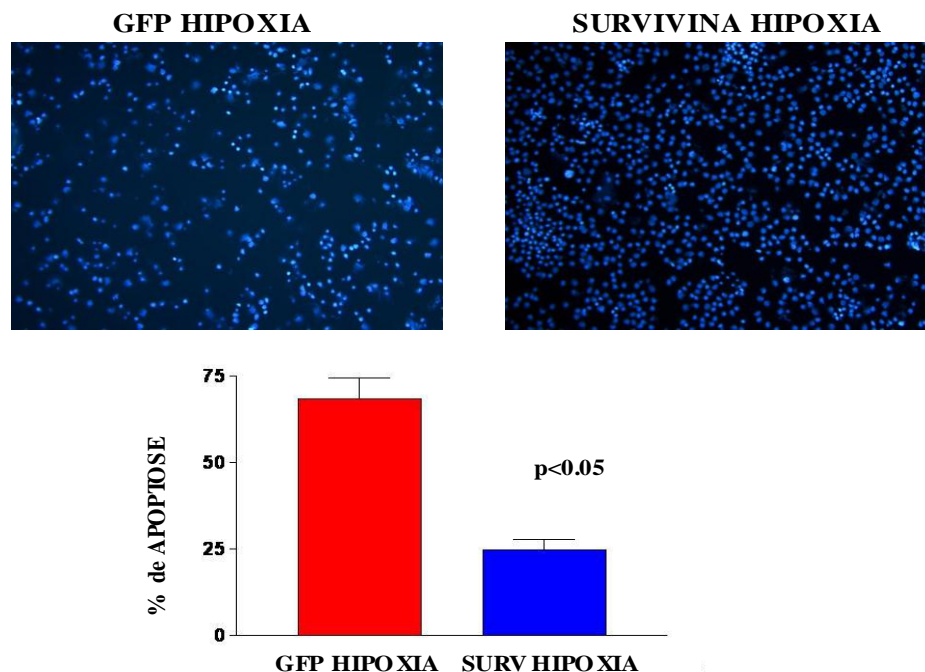
GRÁFICO 2 - PROTEÇÃO ANTIAPOPTÓTICA OFERECIDA POR SURVIVINA APÓS INSULTO CITOTÓXICO. ILHOTAS DE CAMUNDONGOS FORAM ISOLADAS E DISTRIBUÍDAS EM TRÊS GRUPOS DE TRATAMENTO: CONTROLE, GFP E SURVIVINA EM UMA PLACA DE CULTURA CONTENDO 96 MEIOS. APÓS CULTURA INICIAL NA PRESENÇA DE VETORES VIRAIS, AS ILHOTAS FORAM EXPOSTAS A COQUETEL DE CITOQUINAS CONTENDO IL1-BETA, TNF-ALFA E IFN-GAMA. O RESULTADO DEMONSTRA A MÉDIA OBTIDA EM TRÊS EXPERIMENTOS INDEPENDENTES.



#### 4.6 COLORAÇÃO DE DAPI PARA ANÁLISE DE APOPTOSE MEDIANTE MORFOLOGIA NUCLEAR

Como demonstrado na FIGURA 13, de maneira significativa a survivina protege as ilhotas, resguardando-as tanto da morte celular induzida por hipóxia quanto da ausência de fatores de crescimento. Cerca de 62.8% das ilhotas submetidas à transdução mediante vetor viral isolado e GFP apresentaram características marcantes do processo de apoptose, como cromatina condensada e fragmentação de DNA. Em contraste, em análise morfológica nuclear, apenas 21.2% das ilhotas no grupo transduzido com survivina apresentaram sinais de apoptose ( $p<0.05$ ).

FIGURA 13 - PROTEÇÃO OFERECIDA PELA TRANSDUÇÃO DE SURVIVINA EM ILHOTAS SUBMETIDAS A INSULTO HIPÓXICO E À PRIVAÇÃO DE NUTRIENTES. ILHOTAS TRANSDUZIDAS COM SURVIVINA E GFP FORAM INCUBADAS, SEM ADIÇÃO DE NUTRIENTES, EM AMBIENTE COM BAIXO TEOR DE OXIGÊNIO. O RESULTADO DEMONSTRATIVO EXPÕE A MÉDIA DE TRÊS EXPERIMENTOS INDEPENDENTES.



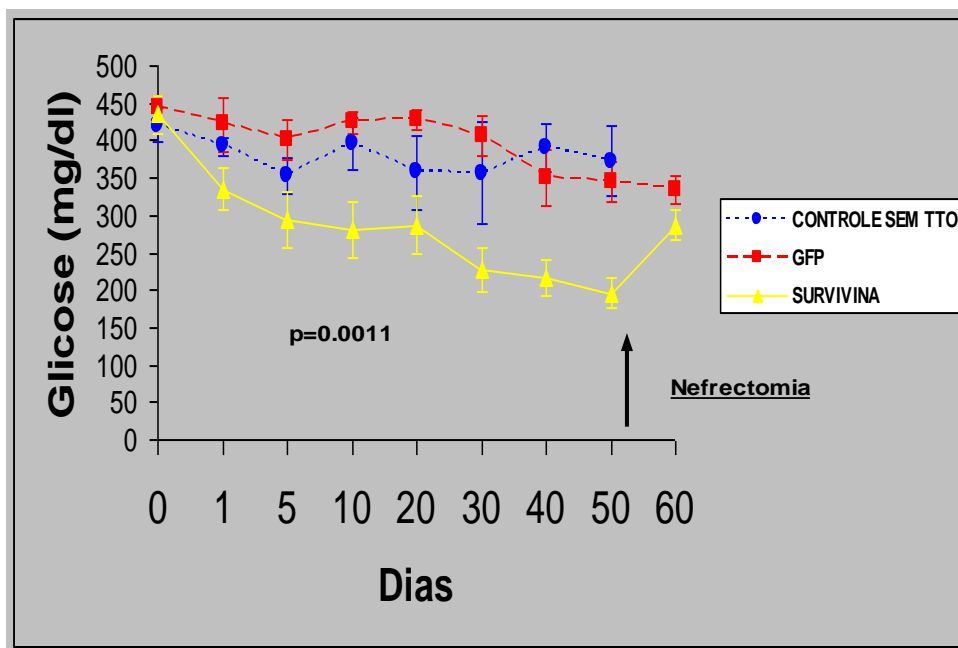
## 4.7 TRANSPLANTE DE ILHOTAS

### 4.7.1 Transplante de Ilhotas Marginal Singênico

Como demonstrado no GRÁFICO 3, animais que receberam ilhotas transduzidas com survivina apresentaram uma tendência significativa à normoglicemia, enquanto animais recipientes de enxertos não tratados ou transduzidos com GFP apenas permaneceram hiperglicêmicos. Não se observou diferença nos valores de glicose sérica entre os grupos no início do experimento. Em praticamente todos os registros de avaliação de glicemia pós-transplante, no decorrer do tempo, animais com enxerto transduzido com survivina apresentaram valores de glicemia sérica significativamente inferiores aos encontrados em ambos os grupos controle. Cinquenta dias após o transplante, a média de glicose sérica encontrada em receptores de ilhotas transduzidas com survivina foi de  $191 \pm 18$  mg/dl comparada à de  $360 \pm 28$  mg/dl em animais do grupo GFP ( $p < 0.005$ ).



GRÁFICO 3 - EVOLUÇÃO DA GLICOSE SÉRICA EM RECIPIENTES DE ENXERTOS MARGINAIS SINGÊNICOS DE ILHOTAS. CAMUNDONGOS C57BL/6, COM DIABETES QUIMICAMENTE INDUZIDA, RECEBERAM ENXERTO DE 200 ILHOTAS SINGÊNICAS INCUBADAS EM MEIO DE CULTURA APENAS, TRANSDUZIDAS COM  $2.5 \times 10^7$  UFI DE PAD-GFP OU COM  $2.5 \times 10^7$  UFI DE PAD-SURVIVINA ( $P=0.0011$  ENTRE O GRUPO SURVIVINA E OS DOIS GRUPOS CONTROLE-ANOVA).



Além disso, camundongos com níveis reduzidos de glicose sérica do grupo survivina foram submetidos à nefrectomia do rim que continha o enxerto e verificou-se aumento dos níveis glicêmicos, demonstrando a dependência desses animais no enxerto funcionante de ilhotas.

#### 4.7.1.2. Imunoistoquímica para detecção de survivina em enxertos marginais singênicos

Dois animais de cada grupo tiveram seus enxertos retirados no quarto e quinquagésimo dias após transplante para imunoistoquímica. Em nenhum momento avaliado registrou-se expressão do gene survivina, tanto em animais do grupo GFP, quanto em animais do grupo controle sem tratamento. A FIGURA 14 ilustra o aspecto

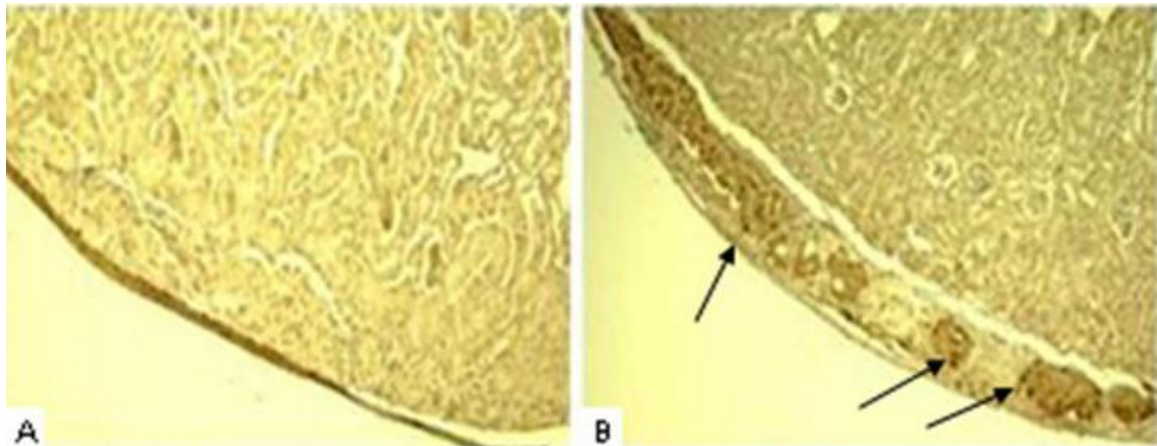
de um enxerto viável e totalmente revascularizado cinquenta dias após o transplante de ilhotas.

FIGURA 14 - MACROSCOPIA DE UM ENXERTO MARGINAL SINGÊNICO FUNCIONANTE DE ILHOTAS NO ESPAÇO SUBCAPSULAR RENAL. A MASSA DE ILHOTAS CORRESPONDE A 200 ILHOTAS TRANSDUZIDAS COM SURVIVINA NO QÜINQUAGÉSIMO DIA DE PÓS-TRANSPLANTE.



Ilhotas submetidas a processo de transdução mediante pAd-survivina e transplantadas em um modelo marginal de transplante reagiram fortemente à imunoistoquímica pela ação do anticorpo anti-survivina. Em corte perpendicular em relação ao maior eixo renal de rins contendo enxerto de ilhotas transduzidas com survivina, evidenciou-se a expressão do gene survivina de uma maneira uniforme nas células das ilhotas (FIGURA 15). Em contrapartida, nas ilhotas transduzidas com o vetor viral apenas, ou seja pAd-GFP, a expressão da proteína survivina mostrou-se nula. Além disso, a análise imunoistoquímica de ilhotas transduzidas com survivina cinquenta dias após o transplante não revelou expressão da referida proteína.

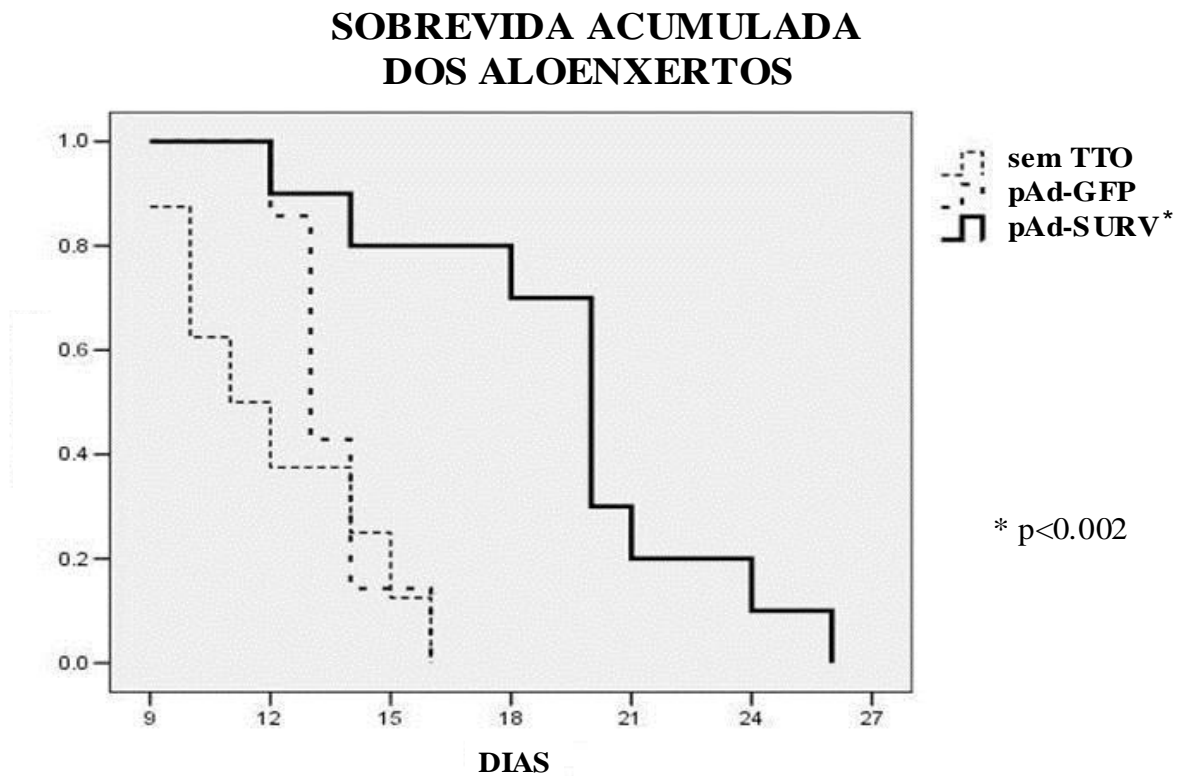
FIGURA 15- IMUNOISTOQUÍMICA EM ENXERTOS MARGINAIS DE ILHOTAS TRANSPLANTADOS SOB A CÁPSULA RENAL. A- ILHOTAS TRANSDUZIDAS COM PAD-GFP COM AUSÊNCIA DE EXPRESSÃO DE SURVIVINA. B- ILHOTAS TRANSDUZIDAS COM PAD-SURVIVINA DEMONSTRANDO EXPRESSÃO DE SURVIVINA DISTRIBUÍDA UNIFORMEMENTE NO ENXERTO(SETAS). IMUNOISTOQUÍMICA REALIZADA EM ENXERTOS COM QUATRO DIAS DE PÓS-TRANSPLANTE UTILIZANDO-SE ANTICORPO SECUNDÁRIO CONJUGADO À DAB-COLORAÇÃO MARROM. AUMENTO DE 40X.



#### 4.7.2 transplante de ilhotas ideal alogênico

Para avaliar o efeito protetor da proteína survivina em um modelo animal envolvendo resposta imune, transplantou-se em camundongos C57bl/6 diabéticos uma massa ideal de quatrocentas ilhotas, isoladas de camundongos Balb/c. Camundongos recipientes de enxertos de ilhotas não tratadas ou tratadas com o vetor viral apenas (pAd-GFP) rejeitaram seus enxertos, em sua totalidade, até o fim da segunda semana após o transplante. Não se verificou diferença significativa entre os dois grupos controle quanto ao tempo de rejeição. Em contrapartida, camundongos recipientes de enxertos tratados com survivina apresentaram sobrevida prolongada de forma significativa de seus enxertos quando comparados aos grupos controle  $p < 0.002$  (GRÁFICO 4). Apesar da maior sobrevida, todos os animais desse grupo invariavelmente sofreram rejeição, com seus enxertos atingindo destruição completa, além de apresentarem hiperglicemia.

GRÁFICO 4 - GRÁFICO DE KAPLAN MEIER ILUSTRANDO A SOBREVIDA DOS ENXERTOS DE ILHOTAS EM MODELO DE TRANSPLANTE ALOGÊNICO IDEAL. ENXERTOS ALOGÊNICOS TRATADOS COM SURVIVINA VERSUS GRUPO CONTROLE SEM TRATAMENTO E GRUPO TRATADO COM PAD-GFP. (CONTROLE SEM TRATAMENTO N=8, PAD-GFP N=7 E PAD-SURVIVINA N=10),  $P<0.002$ .



#### 4.7.3. Acompanhamento do Peso Peritransplante nos Receptores de Enxerto Ideal Nod/Scid

Não se registrou diferença entre o peso dos grupos controle (não tratado e tratado com pAd-GFP) e o peso dos recipientes do grupo com enxerto transduzido com pAd-survivina (TABELA 6). Da mesma forma, a reversão do diabetes se mostrou semelhante entre os grupos, com os níveis glicêmicos mantendo um mesmo padrão no período pós-transplante.

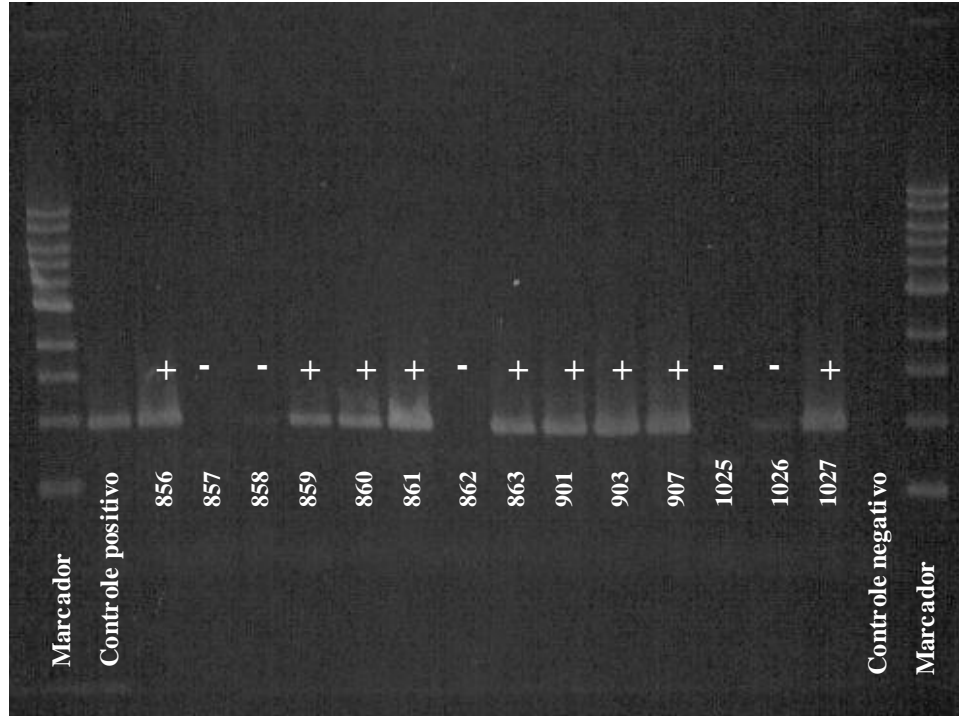
TABELA 6 - PESO E VALORES DE GLICOSE SÉRICA EM CAMUNDONGOS NOD/SCID DIABÉTICOS, RECEPTORES DE ENXERTO DE ILHOTAS IDEAL ALOGÊNICO. EVOLUÇÃO DO PESO E GLICOSE SÉRICA NO INTERVALO DE 0 A 50 DIAS APÓS O TRANSPLANTE DE ILHOTAS. P= PESO EM GRAMAS E GLI=GLICOSE SÉRICA EM MG/DL. DIA 0= TRANSPLANTE DE ILHOTAS.

Dias pós-transplante	Controle 1		Controle 2		GFP1		GFP2		survivina 1		survivina 2	
	p	gli	p	gli	p	gli	p	gli	p	gli	p	gli
0	19.6	420	22	>500	17.8	>500	20.7	457	24.3	>500	21.4	>500
1	19	89	21.3	98	17	178	20.3	107	24.1	243	21.1	89
3	19.3	79	21.8	103	18	112	21	95	24.7	200	22.9	85
5	19.3	76	23	117	18.9	98	22.1	88	24.2	151	22.9	99
7	20	91	23.8	106	20	97	23.6	94	24.8	181	22.6	99
14	20.5	106	24.3	98	21.5	86	25.8	97	25.3	157	23.8	109
21	20.8	87	24.5	86	23	95	25.6	105	26.3	202	24.6	111
28	21	96	26	103	23.8	102	27.4	110	26.5	160	25.1	100
35	22.7	95	26.3	117	24.7	110	27.1	97	26.7	116	25.5	107
42	23	110	27	109	24.9	98	27.3	96	27.8	99	26	117
50	24.2	118	28.2	123	26.3	96	28.2	100	27.9	117	27.2	112

#### 4.8 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

O genótipo das progênes resultantes do cruzamento entre camundongos NOD (WT) e NOD transgênicos (survivina) foram checados mediante reação em cadeia da polimerase. A viabilidade dos filhotes foi de 100%, não sendo observada a incidência de camundongo natimorto. A FIGURA 16 ilustra o resultado de um experimento em que se testou a presença do gene survivina no DNA extraído da cauda dos camundongos.

FIGURA 16 - BANDAS POSITIVAS PARA SURVIVINA EM GEL DE AGAROSE. DNA EXTRAÍDO DA CAUDA DE CAMUNDONGOS FOI DIGERIDO E SUBMETIDO À REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE. CAMUNDONGOS COM BANDAS POSITIVAS FORAM CONSIDERADOS TRANSGÊNICOS. CAMUNDONGOS COM AUSÊNCIA DE BANDAS FORAM CLASSIFICADOS COMO WT.

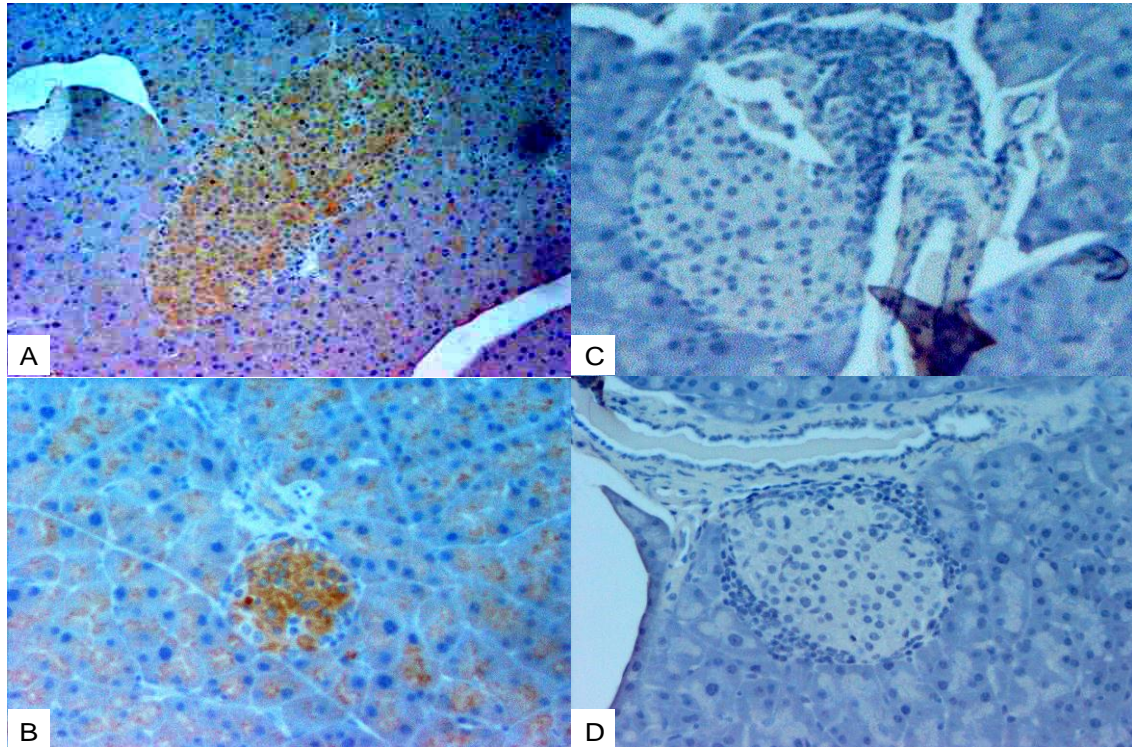


#### 4.9 IMUNOISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE SURVIVINA EM PÂNCREAS DE CAMUNDONGOS NOD TRANSGÊNICOS PARA SURVIVINA

Camundongos NOD transgênicos para survivina apresentam excelente expressão da proteína survivina na idade de dez semanas. Evidencia-se tal presença, indiretamente, pela distribuição uniforme do marcador secundário DAB à imunohistoquímica por toda extensão insular. Ilhotas de camundongos do tipo selvagem apresentam ausência completa da expressão do gene survivina (FIGURA 17).



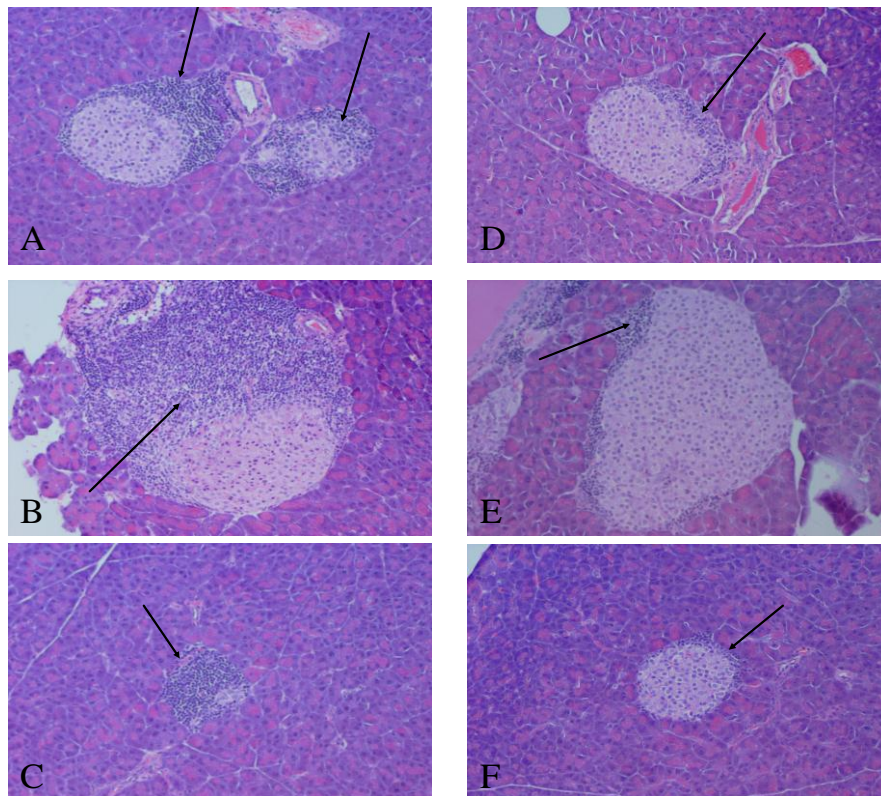
FIGURA 17 - IMUNOISTOQUÍMICA EM TECIDO PANCREÁTICO DE CAMUNDONGOS NOD TRANSGÊNICOS PARA SURVIVINA E CONTROLES DO TIPO SELVAGEM (WT). A E B DEMONSTRAM A EXPRESSÃO DE SURVIVINA EM TODA A EXTENSÃO DA ILHOTA. C E D SÃO PREPARAÇÕES DE PÂNCREAS DE CAMUNDONGOS DO TIPO SELVAGEM PROCESSADAS EM PARALELO. (A E B- 100X; C E D-200X).



#### 4.10 ANÁLISE DE INSULITE EM CAMUNDONGOS NOD/LTJ FÊMEAS TRANSGÊNICOS PARA SURVIVINA E TIPO SELVAGEM (WT)

Estudo histológico de pâncreas provenientes de camundongos NOD fêmeas de dez semanas de idade demonstrou a presença de insulite tanto no grupo de animais transgênicos para survivina como em animais do tipo selvagem (FIGURA 18). Entretanto, camundongos transgênicos para survivina apresentaram ilhotas com arquitetura totalmente preservada nessa idade, em contraste com camundongos tipo selvagem, os quais acusaram a presença de insulite de 50% ou mais em todas as ilhotas. De fato, camundongos tipo selvagem possuíam algumas estruturas insulares totalmente destruídas pela infiltração linfocitária, fato não observado em animais transgênicos.

FIGURA 18 - PROCESSO DE INSULITE EM CAMUNDONGOS NOD TRANSGÊNICOS PARA SURVIVINA E CONTROLES DO TIPO SELVAGEM (WT). A-C: AMOSTRAS DE TRÊS ANIMAIS DIFERENTES TIPO SELVAGEM. NOTOU-SE A PRESENÇA DE INFILTRADO LINFOCITÁRIO ACOMETENDO MAIS DE 50% DA ÁREA INSULAR EM B E C, COM DESTRUIÇÃO TOTAL DA ARQUITETURA DA ILHOTA EM C. D-F: AMOSTRAS DE TRÊS CAMUNDONGOS TGN PARA SURVIVINA. A PRESENÇA DE INSULITE É EVIDENTE, MAS EM MENOR INTENSIDADE COMPARADO AO CAMUNDONGO TIPO SELVAGEM. A MAIORIA DAS ILHOTAS AINDA PRESERVA SUA ARQUITETURA. SETAS- INFILTRAÇÃO LINFOCITÁRIA (100X).

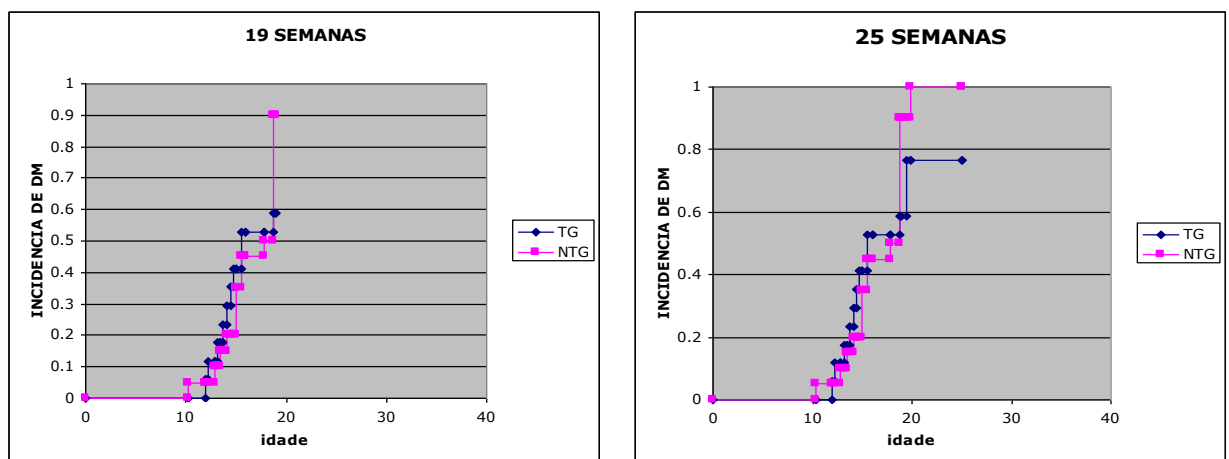




#### 4.11 INCIDÊNCIA DE DIABETES EM CAMUNDONGOS NOD/LTJ FÊMEAS TRANSGÊNICOS PARA SURVIVINA E EM CAMUNDONGOS NOD/LTJ FÊMEAS TIPO SELVAGEM (WT)

Com dezenove semanas de idade, o grupo de camundongos transgênicos para survivina apresentou uma menor incidência de diabetes quando comparado ao grupo tipo selvagem (60% vs. 90%, respectivamente  $p=0.05$ ). Na idade de vinte e cinco semanas, a incidência de diabetes foi menor nos camundongos transgênicos (80% vs. 100%), não sendo, porém, essa diferença estatisticamente significativa ( $p=0.1$ ) (GRÁFICO 5).

GRÁFICO 5 - INCIDÊNCIA DE DM EM CAMUNDONGOS NOD TRANSGÊNICOS PARA SURVIVINA E CONTROLES TIPO SELVAGEM (WT). 19 SEMANAS  $P=0.05$  E 25 SEMANAS  $P=0.1$ .





## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 O MODELO ANIMAL:

#### 5.1.1 Transplante de Ilhotas em Camundongos

O transplante de ilhotas em camundongos constitui um modelo extremamente importante tanto para o estudo da fisiopatologia quanto para o tratamento do diabetes em mamíferos. A utilização das cepas de camundongos denominadas *inbred*, como a C57Bl/6, Balb/c e NOD/Ltj, permite não apenas o controle sobre a amostra mas também a eliminação de diversas variáveis. Entre outras vantagens, a utilização do camundongo inclui: pequeno porte, docilidade, facilidade de manuseio e possibilidade de alojamento de grande número de animais em pequenos espaços, quando comparado a mamíferos de maior porte.

O protocolo que contempla o isolamento das ilhotas de Langerhans de murinos mediante utilização da enzima collagenase para digestão do tecido pancreático passou a ser largamente utilizado em pesquisas, desde que tal procedimento foi descrito por LACY e KOSTIANOVSKY, em 1967. Apesar dos avanços e aceitação, esse método ainda apresenta algumas imperfeições. Uma das dificuldades reside no fato de se necessitar de cinco ou seis camundongos doadores para obtenção da quantidade de ilhotas necessárias à reversão do diabetes químico em um receptor apenas (AUERSVALD *et al.*, 1997; BASADONNA *et al.*, 1998). O método de SALVALAGGIO *et al.* (2002), utilizado no presente estudo, caracteriza-se pela rapidez, baixo custo e relativa simplicidade para ser reproduzido, embora, reconheça-se, igualmente ineficiente. O método de RICORDI *et al.* (1988), utilizado nos dias atuais em praticamente todos os grandes centros de isolamento de ilhotas para pesquisa e/ou para transplante clínico, utiliza uma câmara de aço inoxidável, hermeticamente fechada, com esferas de vidro e com um sensor de temperatura em seu interior para digestão do tecido pancreático. Amostras sequenciais do tecido pancreático em digestão facilitam o controle do isolamento, tornando o método mais preciso. Como

resultado, um número maior de ilhotas é isolado de cada órgão e, conseqüentemente, há um decréscimo no número necessário de doadores (dois a três) para um transplante de sucesso.

A indução química de diabetes por meio da droga estreptozotocina não reflete o quadro de diabetes insulínico dependente de natureza auto-imune que acomete a grande maioria de pacientes que necessitam de um transplante de pâncreas ou de ilhotas. Entretanto, impõe-se como um método relativamente fácil de ser reproduzido, e que oferece bons resultados, oferecendo recipientes que apresentam um grau de hiperglicemia estável, ideal para estudo tanto dos efeitos quanto dos resultados do transplante de ilhotas. A maior dificuldade do método reside na injeção intravenosa através de uma das veias caudais laterais. Injeção intraperitoneal também pode ser utilizada, mas os resultados são inconsistentes, com maior porcentagem dos camundongos atingindo apenas valores glicêmicos de 150-300 mg/dl; além disso, caso não se destruam completamente as células produtoras de insulina após a primeira dose, desencadeia-se um mecanismo de tolerância à estreptozotocina. O animal, após uma segunda dose de estreptozotocina, pode ou evoluir para um estado de diabetes extremamente debilitante com evolução rápida para a morte ou permanecer com valores glicêmicos intermediários. Com a dosagem de 180-200 mg por quilograma de peso, ofertada por via intravenosa, obtêm-se valores de glicose sérica entre 400 e 500 mg/dl em cerca de 90% dos camundongos.

No modelo singênico marginal de ilhotas utilizaram-se camundongos C57Bl/6; no transplante alogênico, selecionaram-se como doadores camundongos Balb/c (H-2<sup>d</sup>), e como receptores, camundongos C57Bl/6 (H-2<sup>b</sup>) e camundongos NOD/LtSz-*Prkdc*<sup>scid</sup>. A combinação Balb/c e C57Bl/6 oferece um ótimo modelo de rejeição alogênica, visto que receptores não submetidos à imunossupressão mostram-se incapazes de preservar enxertos em funcionamento em período que ultrapasse duas semanas pós-transplante. Essa combinação de cepas tem sido utilizada extensivamente na literatura para estudos tanto de imunossupressão quanto de rejeição de enxertos. (AUERSVALD *et al*, 1997; BASADONNA *et al*, 1998, FECTEAU *et al*, 2001)

Camundongos homozigotos para mutação de imunodeficiência intensa combinada (*Prkdc<sup>scid</sup>*, comumente referidos como *scid*) caracterizam-se pela ausência de células T e B funcionais, linfopenia, hipogamaglobulinemia e demais células hematopoiéticas normais (CUSTER; BOSMA, G.C. e BOSMA, M.J., 1985). Células apresentadoras de antígeno, células de linhagem mielóide e células *natural killer* (NK) com função normal são cepa-dependentes. Camundongos *scid* apresentam defeito no reparo de DNA e no rearranjo de genes que codificam nos linfócitos os receptores específicos de antigenicidade (BLUNT *et al*, 1995; BLUNT *et al*, 1996). Camundongos *scid* aceitam enxertos alográficos e xenográficos, o que os destaca como modelo ideal para experimentos de transferência celular. Camundongos NOD/LtSz-*Prkdc<sup>scid</sup>* não se sujeitam à ação de insulite e de diabetes ao longo de sua vida e, por esse motivo, servem de controle para comparação com camundongos NOD/LtJ. Por serem ótimos recipientes de alo e xenoenxertos, camundongos NOD/LtSz-*Prkdc<sup>scid</sup>* são úteis também para delineamento dos efeitos citotóxicos de manipulação genética em enxertos celulares. No presente estudo, alguns camundongos desta cepa foram utilizados como receptores de enxerto de ilhotas transduzidas com o gene survivina com o objetivo de se detectar a existência de citotoxicidade do vetor viral e/ou do gene survivina. Comparando-se a receptores controle sem transdução em seus enxertos, camundongos NOD *scid* que receberam ilhotas transduzidas com adenovírus e survivina apresentaram padrão semelhante de recuperação pós-transplante com peso e valores glicêmicos registrando resultados comparáveis.

### 5.1.2 Camundongos NOD como Modelo de Diabetes Auto-Imune

A cepa escolhida para o estudo de incidência de diabetes foi a NOD/Ltj, animal que apresenta uma evolução clínica particularmente semelhante às características observadas no desenvolvimento do diabetes insulínico dependente que ocorre em humanos. O desenvolvimento de diabetes no NOD/LtJ caracteriza-se pelo aparecimento de insulite, um infiltrado leucocitário nas ilhotas pancreáticas. Uma significativa redução na secreção de insulina ocorre por volta de doze semanas de

idade nas fêmeas e várias semanas mais tarde nos machos. Diagnostica-se o início de diabetes pela presença de glicosúria moderada e por uma glicose sérica de jejum maior que 250mg/dl. Os camundongos diabéticos apresentam hipoinsulinemia e hiperglucagonemia, indicando uma destruição seletiva das células *beta* pancreáticas. De acordo com LEITER (1997), a susceptibilidade ao *diabetes mellitus* insulínica dependente (DMID) em camundongos NOD/LtJ apresenta-se de uma maneira poligênica e influenciada por fatores externos, incluindo habitat, estado de saúde e dieta. A preferência pela utilização de fêmeas em relação aos machos tem razão direta com os resultados: os sintomas de DMID ocorrem mais cedo e com maior incidência nas fêmeas (90-100% até 30 semanas de idade). Todos os experimentos de incidência de diabetes e de estudo histológico de insulite utilizaram apenas fêmeas NOD/Ltj no presente estudo. Machos desenvolvem DMID em uma frequência entre 40-60% até 30-40 semanas de idade. A colônia do laboratório de transplante da Universidade de Massachusetts apresenta uma incidência de diabetes aproximando-se de 100% nas fêmeas e de 30% nos machos na idade de 35 semanas. O maior componente da susceptibilidade ao DMID no NOD/LtJ destaca-se pelo seu único haplótipo MHC H2<sup>g7</sup> (SERREZE *et al*, 1997 e FESTING, 1999). Por essa susceptibilidade ao diabetes, a cepa NOD/Ltj foi considerada um excelente modelo para se testar a hipótese de que o gene survivina, quando presente nas ilhotas pancreáticas, exerceria um efeito protetor, evitando ou retardando a destruição auto-imune.

## 5.2 O VETOR ADENOVIRAL

No presente estudo, utilizou-se um adenovírus replicante defeutivo que permanece viável por um período de cinco a dez dias. A utilização de um vetor viral da família *lentiviridae* (KEARNS-JONKER *et al.*, 2004) levaria a uma expressão permanente do gene survivina. Como os efeitos da expressão permanente de uma potente proteína antiapoptótica não são totalmente conhecidos e, em razão da própria natureza oncogênica da survivina (AMBROSINI *et al*, 1997; ISLAM *et al*, 2000), o objetivo deste trabalho concentrou-se em um estudo capaz de avaliar os efeitos dessa

proteína *in vitro* e durante os primeiros dias de pós-transplante nos modelos *in vivo*. Nesse período, pelo fato de o enxerto de ilhotas consistir em um enxerto avascular, credita-se perda significativa de massa insular funcionante à hipóxia e à privação de nutrientes às células transplantadas.

O método de purificação de adenovírus de gradiente de cloreto de cério apresenta-se como o mais conhecido na literatura (HOSOKAWA *et al.*, 2005) embora represente uma técnica demorada e extremamente complexa oferecendo concentrações de vírus purificado de  $10^6$  a  $10^8$  UFI. O processo de purificação de adenovírus que utiliza o *kit* da Beckton and Dickenson, adotado no presente estudo, destaca-se não apenas como mais rápido, mas também que oferece como resultado concentrações virais cem vezes maiores que as obtidas por meio do método de cloreto de cério (GRAHAM, PREVEC, 1991; HUTCHINS, 2002). Para todos os experimentos realizados *in vitro* e *in vivo* foram necessários dois processos de amplificação-purificação de adenovírus-GFP e três de adenovírus-survivina-GFP.

### 5.3 EXPRESSÃO DE SURVIVINA EM ILHOTAS DE LANGERHANS

Como descrito anteriormente, o gene survivina está presente em tecidos fetais e sua expressão se amplia em diversos tipos de neoplasias malignas, como adenocarcinoma de cólon, adenocarcinoma de próstata e melanoma (ALTIERI, 2003). Sua expressão em tecidos adultos normais restringe-se a tecidos como o fígado, que se caracteriza por sua acentuada capacidade de regeneração. E, destaque-se, que mesmo nesse órgão, o fígado, a expressão de survivina é mínima. Como se evidencia mediante imunofluorescência direta para a proteína GFP conjugada ao vetor viral, ilhotas transduzidas com o vetor apresentaram luminosidade verde em localização e em intensidade diretamente proporcional à concentração viral utilizada. Ilhotas não submetidas a transdução viral acusaram ausência completa de proteína GFP e, conseqüentemente, do gene survivina. Concentrações do vetor viral superiores a  $10^7$  UFI, em incubação de doze horas, foram responsáveis por boa expressão viral. É importante frisar que apenas concentrações virais de mais de  $2.5 \times 10^7$  UFI acusam a

presença de expressão de survivina e de proteína GFP com um padrão uniforme no centro das ilhotas.

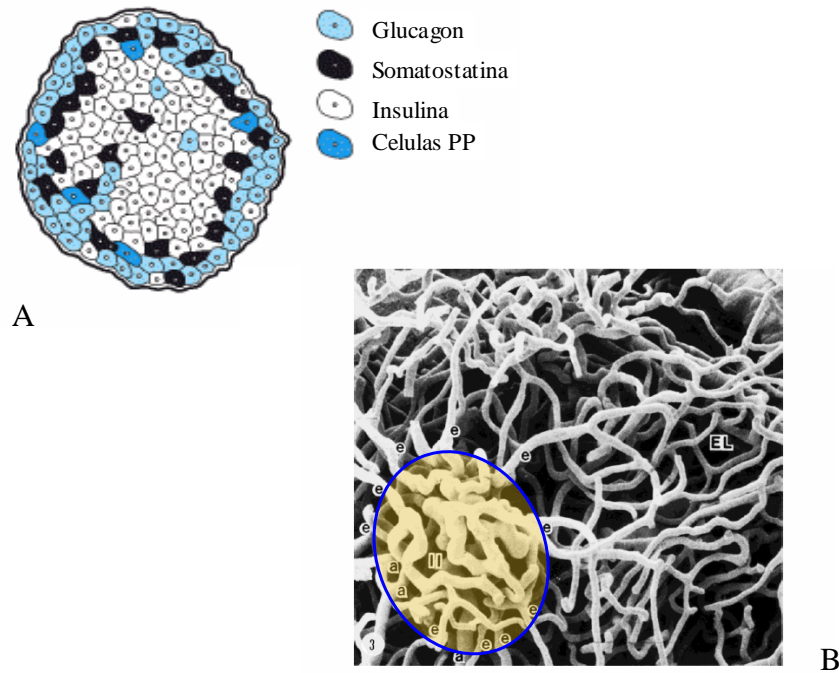
Os experimentos de *imunoblot* em que se utilizam ilhotas íntegras transduzidas com o gene survivina demonstraram excelente expressão dessa proteína em doses superiores a  $2.5 \times 10^7$  UFI. Esses resultados do *western* e os resultados da imunoistoquímica de ilhotas em parafina se complementam, haja vista a expressão por *western blot* refletir a quantidade absoluta da proteína sem fornecer qualquer informação sobre localização e efetividade de penetração do vetor viral nas regiões da uma ilhota transduzida. O estudo bidimensional de cortes randômicos de ilhotas, embebidas em parafina e submetidas à imunoistoquímica, forneceu a informação sobre a efetividade da infecção do vetor viral com a dose escolhida e, conseqüentemente, da expressão aumentada do gene survivina nas células *beta* pancreáticas.

Apesar de relatos na literatura utilizando terapia gênica em ilhotas de Langerhans com tempo de incubação de vetores virais em cultura por período de apenas algumas horas (JIN; XIE, 2003; GREY *et al.*, 2003), no presente estudo, notaram-se melhores resultados quando o vetor viral permaneceu em cultura por um período de doze horas. Não se tome como referência o tempo de incubação com vetores virais utilizado em estudos realizados com células individuais em suspensão, que geralmente respeita um período de incubação de uma a duas horas (GOEDDE *et al.*, 2001; NAGAHAMA *et al.*, 2002). A estrutura de uma ilhota recém-isolada permanece intacta com relação à sua arquitetura celular e sua cápsula, mas o sistema capilar é interrompido. A transdução de uma ilhota íntegra é bem mais difícil de ser efetuada comparada a células individuais, pois o vetor viral precisa ser difundido da periferia para o centro para atingir as células *beta*, produtoras de insulina. A FIGURA 19 ilustra a organização endócrina insular, bem como seu sistema capilar intacto quando ainda entremeada ao tecido exócrino do pâncreas.

No presente estudo, incubações com concentrações virais maiores do que  $3 \times 10^7$  UFI, ou na dose de  $2,5 \times 10^7$  UFI por período superior a dezesseis horas foram associadas ao rompimento da cápsula e à degranulação de ilhotas com conseqüente morte celular.



FIGURA 19 - ARQUITETURA DE UMA ILHOTA DE LANGERHANS. A- DIAGRAMA REPRESENTATIVO DA DISTRIBUIÇÃO DAS DIVERSAS CÉLULAS DE SECREÇÃO ENDÓCRINA EM UMA ILHOTA. B- MICROSCOPIA ELETRÔNICA ILUSTRANDO O SISTEMA CAPILAR SINUSAL DE UMA ILHOTA *IN SITU*.



#### 5.4 PADRÃO DE SECREÇÃO DE INSULINA EM ILHOTAS EXPRESSANDO SURVIVINA E GFP

Após definida a dose ideal de unidades formadoras de infecção (UFI) de  $2,5 \times 10^7$ , centrou-se o foco da pesquisa na próxima dúvida a ser respondida: se o adenovírus e/ou o gene survivina poderiam interferir funcionalmente na secreção de insulina de ilhotas recém-isoladas.

Diferentemente de ilhotas de ratos, ilhotas de camundongos respondem debilmente à glicose apenas, quando submetidas à perfusão dinâmica (LENZEN, 1979; BERGLUND, 1980; MA *et al.*, 1995; ZAWALICH *et al.*, 1995); entretanto, quando se adiciona o carbacol, um parassimpatomimético com ação muscarínica, desencadeia-se geralmente uma resposta imediata e sensível na liberação de insulina

(GARCIA *et al.*, 1988; ZAWALICH WS, ZAWALICH KC, 1996; GILON e HENQUIN, 2001). Levando-se em consideração que uma disfunção discreta no processo secretório seria difícil de ser detectada se apenas glucose fosse utilizada como estimulante, decidiu-se como apropriado, avaliar-se a secreção de insulina utilizando-se uma efetiva combinação agonista.

Não se comprovou diferença entre os grupos estudados quanto ao padrão secretório de insulina de ilhotas isoladas. Tanto o vetor viral apenas quanto o vetor associado ao gene survivina apresentaram o mesmo padrão de secreção hormonal. ZHOU *et al.* (2000) demonstraram que a transdução de ilhotas de camundongos com o gene Bcl-xl, uma das proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2, comprometeu a secreção de insulina por mecanismo de interferência com a sinalização mitocondrial. Como, no presente estudo, não se detectou alteração da secreção de insulina pela expressão aumentada de survivina, o diferencial seria atribuído à localização do Bcl-xl na membrana mitocondrial externa (CORY e ADAMS, 2002) em contraste com a survivina, localizada entre as membranas interna e externa das mitocôndrias (DOHI *et al.*, 2004).

## 5.5 EFEITO PROTETOR DA SURVIVINA CONTRA APOPTOSE

Uma das causas principais do insucesso atual com o transplante de ilhotas pancreáticas se deve à rápida perda de viabilidade do enxerto recém-transplantado, motivo que tem adstrito esta modalidade terapêutica a centros especializados, sob um rigoroso contexto de protocolos de estudo. PARASKEVAS *et al.*, 1997, e PARASKEVAS *et al.*, 2000, caracterizaram, em detalhes, que ilhotas em cultura morrem por estímulo apoptótico, termo melhor definido por morte celular programada. Esse fenômeno toma lugar em resposta a uma miríade de estímulos, muitos dos quais de natureza não imunológica. As técnicas de isolamento de ilhotas, principalmente enzimas digestivas, geram ativação do complemento (JAHR *et al.*, 1995) e a ruptura das interações da matriz celular (THOMAS, FT *et al.*, 1999; THOMAS, FT *et al.*,

2001) com conseqüente iniciação da cascata apoptótica *in vitro* e morte celular do enxerto no recipiente.

Os efeitos antiapoptóticos do gene survivina, apesar desse mesmo gene ter sido descoberto recentemente, são relativamente bem conhecidos no campo da oncologia. A survivina identifica-se como um potente regulador de citoproteção, de diferenciação e de divisão celulares (ALTIERI 2003). Seu potencial em células normais, entretanto, não foi ainda bem definido. O presente estudo trouxe as primeiras informações referentes à expressão aumentada de survivina e o potencial efeito antiapoptótico em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos.

No período de pós-transplante imediato há uma resposta inflamatória intensa no enxerto, mesmo no contexto singênico. Essa resposta inclui secreção aumentada das citocinas interleucina-1 $\beta$ , fator de necrose tumoral- $\alpha$  e interferon- $\gamma$  (DELANEY *et al.*, 1997; MAEDLER *et al.*, 2002). Paralelamente, o fato de o transplante de ilhotas efetuar-se mediante um enxerto avascular, os primeiros dias após o implante caracterizam-se por inadequada ou total ausência de nutrientes e oxigênio, ambiente que induz à perda de uma parcela significativa de ilhotas (CARLSSON *et al.*, 1998). No presente estudo, a transdução de survivina em ilhotas em cultura foi capaz de minimizar os efeitos apoptóticos desencadeados pelo coquetel de citocinas composto por interleucina-1 $\beta$ , fator de necrose tumoral- $\alpha$  e interferon- $\gamma$ , de uma maneira significativa, com ilhotas apresentando um índice apoptótico sete vezes menor quando comparado aos dois grupos controle. O decréscimo de apoptose demonstrado indiretamente pela morfologia nuclear, após privação de oxigênio e de nutrientes em ilhotas cultivadas, também se mostrou significativa. Recentes relatos ratificam a idéia de se creditar à survivina a capacidade de neoformação vascular que ocorre em diversas entidades tumorais (CARMELIET, JAIN, 2000; FAHMY *et al.*, 2003; NAKAYAMA *et al.*, 2004). BLANC-BRUDE *et al.* (2002) demonstraram que a survivina participa na formação da neoíntima em injúria vascular aguda. Utilizando um modelo em que coelhos e camundongos foram submetidos à lesão da artéria íleofemoral por balão e por guia metálico, respectivamente, esses autores demonstraram a expressão aumentada de survivina dois dias após a injúria inicial,

sendo a neoíntima visualizada no sétimo dia. Dessa forma, a presença aumentada de survivina no enxerto poderia ser responsável por uma maior proteção celular e uma acelerada neoformação vascular, funcionando como uma ponte até o restabelecimento de energia e de suporte do tecido recém-transplantado. A expressão transitória de survivina, com o vetor viral composto por adenovírus, traz a vantagem de evitar possíveis efeitos oncogênicos do gene em questão e, ao mesmo tempo, exercer sua função apenas durante o período crítico peritransplante. Tentou-se, no presente estudo, uma análise histológica dos enxertos transduzidos com survivina por meio de imunohistoquímica utilizando-se um anticorpo contra marcadores de neovascularização (PECAN). Não se constatou diferença entre os grupos controle e survivina; entretanto, sabe-se que os anticorpos anticamundongo para esse fim, disponíveis no mercado, não se mostram favoráveis e seus resultados são questionáveis.

Imunoistoquímica anti-survivina efetuada em enxertos transduzidos com survivina cinquenta dias após o transplante demonstra ausência total de expressão da proteína, comprovando o padrão transitório da manipulação genética. O uso do adenovírus como veículo para transdução de survivina mostrou-se seguro no que diz respeito à imunogenicidade do vírus. Análise histológica dos enxertos quatro e cinquenta dias após o transplante não revelou infiltrado linfocitário em resposta ao vetor viral.

O transplante de ilhotas, como citado anteriormente, oferece o potencial de cura do diabetes sem a morbidade associada a um grande procedimento cirúrgico do transplante de pâncreas. Os resultados do transplante clínico de ilhotas de Langerhans melhoraram de forma significativa recentemente. Entretanto, obtém-se normoglicemia permanente apenas quando se processa a infusão de ilhotas provenientes de dois ou mais pâncreas (RYAN *et al.*, 2001). O número de órgãos cadavéricos disponíveis não suporta essa demanda, principalmente, quando se considera que o transplante de um único órgão pancreático apresenta um índice de sobrevida do enxerto maior do que 60% nos primeiros três anos após o procedimento, tanto para transplante de pâncreas

isolado como pâncreas e rim simultâneo ou pâncreas após rim ((International Pancreas Transplant Registry, [www.iptr.umn.edu](http://www.iptr.umn.edu), 2003).

Para se investigar a possibilidade de o efeito citoprotetor e de manutenção da funcionalidade em ilhotas transduzidas com survivina *in vitro* ser observado também *in vivo*, realizaram-se transplantes singênicos em um modelo animal estabelecido utilizando-se um número reduzido de ilhotas. No laboratório de transplante da Universidade de Massachusetts geralmente exigem-se quatrocentas ilhotas de diâmetro igual ou superior a 150  $\mu\text{m}$  para reversão de diabetes quimicamente induzido em camundongos C57Bl/6. Neste experimento, em particular, uma massa marginal de duzentas ilhotas singênicas incubadas em meio de cultura apenas, transduzidas com  $2.5 \times 10^7$  UFI de pAd-GFP ou transduzidas com  $2.5 \times 10^7$  UFI de pAd-survivina foram utilizadas como enxerto.

O transplante marginal de ilhotas que expressam o gene survivina em recipientes diabéticos singênicos demonstrou uma melhora significativa nos níveis de glicose sérica com uma tendência à normoglicemia. Os receptores do grupo com ilhotas transduzidas com survivina não atingiram reversão do diabetes como a que ocorre em receptores que recebem uma massa ideal de 400 ilhotas, mas a diferença dos valores glicêmicos foi marcante quando comparado aos grupos controle. Para demonstrar que os receptores eram dependentes de seus enxertos transduzidos com survivina, realizaram-se nefrectomias dos rins contendo o implante de ilhotas, com conseqüente hiperglicemia. Esse experimento sugere que a massa de ilhotas preservada pela ação de survivina funcionou com uma ponte até a estabilização do enxerto e poderia significar uma alternativa ao transplante clínico de ilhotas.

Diferentemente de outras proteínas antiapoptóticas, a survivina não se expressa em ilhotas normais e interfere no processo de apoptose após a ativação da via intrínseca mitocondrial (FIGURA 20)



definição da proteção oferecida por survivina desde o início do processo de isolamento. Nesse contexto, a injúria desencadeada pelo processo cirúrgico de distensão pancreática por collagenase, o tempo de isquemia quente, os fatores contributórios adicionais da perda de massa funcionante peritransplante e a proteção pelo gene survivina seriam também endereçados.

Com relação aos resultados encontrados no modelo alogênico com massa ideal de ilhotas, notou-se um prolongamento na sobrevida do enxerto quando as ilhotas foram transduzidas com survivina. Eventualmente, todos os recipientes rejeitaram seus enxertos, mas é importante ressaltar que imunossupressão não foi utilizada, sendo previsíveis os resultados com rejeição de 100%. Apesar de o presente estudo não endereçar diretamente os mecanismos envolvidos na morte celular desencadeada pela reação alogênica, a transdução do gene survivina poderia estar associada à uma maior resistência das células da ilhota como um todo, retardando a morte celular e ocasionando uma sobrevida prolongada significativa do enxerto. Esse achado se destaca como extremamente significativo e deve ser explorado mais detalhadamente.

## 5.6 INCIDÊNCIA DO DIABETES EM CAMUNDONGOS NOD/LTJ COM EXPRESSÃO TRANSGÊNICA DE SURVIVINA NAS ILHOTAS DE LANGERHANS.

Existem na literatura diversas linhas terapêuticas que contemplam a prevenção do diabetes tipo I que acomete a cepa de camundongos NOD e que denuncia algumas semelhanças com o DMID humano. A terapia para tal fim ainda é pouco explorada, mas existem relatos de prevenção do diabetes em NODs em animais transgênicos com expressão aumentada de proinsulina-II (FRENCH *et al.*, 1997), receptor de interferon-gama (PRUD'HOMME e GHANG, 1999), Interleuquina-4 (CAMERON *et al.*, 2000) e Interleuquina-10 (YANG *et al.*, 2001).

Allison *et al.* (2000) demonstraram que a expressão aumentada de Bcl-2 é capaz de conferir proteção a ilhotas pancreáticas de C57Bl/6 contra estaurosporina, mas falharam ao contrabalançar os efeitos citotóxicos do agente citotóxico

estreptozotocina. Além disso, a expressão transgênica de Bcl-2 em ilhotas de Langerhans de camundongos NOD não foi suficiente para barrar ou para retardar o processo de destruição celular por linfócitos T CD8+ efetores, acarretando diabetes em incidência comparada aos controles não-transgênicos. No presente estudo, a insulite nas ilhotas pancreáticas de NODs transgênicos para survivina foi retardada e a incidência de diabetes em fêmeas de idade de 19 semanas foi significativamente menor. Uma expressão maior de survivina nas ilhotas poderia ser mais efetiva. O método utilizado nesse último experimento não permitiu uma análise quantitativa do número de cópias do gene nos camundongos transgênicos, fato que poderia revelar a razão de menor insulite e diminuição na incidência de diabetes. Uma vez conhecida a quantidade de cópias do gene survivina associada à proteção total contra destruição de células insulares, animais transgênicos que não desenvolvessem diabetes poderiam ser estudados mais amiúde por mapeamento genético com ênfase na correlação entre a survivina e os genes responsáveis pelo desenvolvimento de diabetes desses animais.

Análise genética por *gene array* em camundongos C57Bl/6 transgênicos para survivina em células produtoras de insulina (DOHI *et al.*, 2005-dados em processo de publicação) mostrou uma assinatura genética compatível com uma regulação aumentada de genes envolvidos na resposta celular ao estresse (Hsp70) (NYLANDSTED *et al.*, 2004), inibição de apoptose (BTG2, TIA1, DUSP1, DUSP6 e MKP3) (FIEDLER *et al.*, 1998; KAWAKAMI *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2004); supressão de inflamação induzida por citocinas e morte celular (SOCS3 e SOCS6) (FUJIMOTO e NAKA, 2003; KARLSEN *et al.*, 2004); e fatores de resposta a hipóxia e geração de angiogênese (VEGF, Egr1 e Siah-1) (CARMELIET e JAIN, 2000; FAHMY *et al.*, 2003; NAKAYAMA *et al.*, 2004). Todos eles ofereceram sua colaboração para determinar as características protetoras de survivina em enxertos de ilhotas pancreáticas.

A terapia gênica com survivina proporciona uma estratégia viável para melhorar a sobrevida do enxerto de ilhotas de camundongos *in vivo*, com uma combinação de mecanismos de inibição de apoptose em células *beta* e ativação de vias protetoras na cascata de morte celular. Apesar de a expressão transitória de survivina



em enxertos de ilhotas e permanente em camundongos NOD transgênicos para sobrevivência não se associar a efeitos colaterais nos animais, ainda há uma necessidade de cuidadosa investigação com relação à ativação de múltiplas vias de sobrevivência e de proliferação celular.

A utilização de terapia gênica por meio de vetores virais não é utilizada na atualidade em enxertos destinados a receptores humanos pelos riscos de se expor um paciente imunodeprimido à carga viral. Além disso, não se sabe exatamente como esses enxertos manipulados geneticamente se comportariam em médio ou longo prazo. As técnicas de laboratório disponíveis e efetuadas em modelos animais oferecem a possibilidade de se testar genes de interesse que possam ser manipulados *a posteriore* sem a utilização de vetores virais, gerando benefício e, ao mesmo tempo, poupando receptores diabéticos de complicações infecciosas indesejadas no período de pós-transplante.





## 6 CONCLUSÃO

- 1) Obteve-se boa expressão de survivina em ilhotas pancreáticas transduzidas com vetor adenoviral mensurada por meio da análise por *imunoblot* e imunofluorescência direta e indireta;
- 2) A transdução do vetor adenoviral, bem como a do gene survivina e GFP não alteraram o padrão secretório de insulina de ilhotas *in vitro*;
- 3) O gene survivina diminui de forma significativa a incidência de apoptose em ilhotas pancreáticas *in vitro* mensurada por MTT e morfologia nuclear;
- 4) Efeitos da transdução do gene survivina *in vivo*:
  - a) uma massa marginal de ilhotas transduzidas com o gene survivina é responsável por níveis glicêmicos próximos à normalidade em receptores singênicos quimicamente diabéticos;
  - b) uma massa ideal de ilhotas transduzidas com o gene survivina é responsável pelo prolongamento significativo da sobrevida de aloenxertos transplantados em camundongos quimicamente diabéticos na ausência de imunossupressão;
  - c) a transdução de survivina em enxertos ideais transplantados em camundongos portadores de imunodeficiência intensa combinada quimicamente diabéticos não foi acompanhada por efeitos colaterais;
- 5) a expressão transgênica de survivina em ilhotas pancreáticas de camundongos fêmea NOD associa-se a um retardo no desenvolvimento de insulite e a uma menor incidência de *diabetes mellitus* na idade de 19 semanas.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLELO, L.; GUILFOYLE, R.; HUEBNER, K.; *et al.* Adenovirus 5 DNA sequences transcribed in transformed human embryo kidney cells (HEK-Ad5 or 293). **Viol.** v.94, p.460-469, 1979.

ALLISON, J.; THOMAS, H.; BECK, D.; *et al.* Transgenic overexpression of human Bcl-2 in islet beta cells inhibits apoptosis but does not prevent autoimmune destruction. **Int. Immunol.** v.12, n.1, p.9-17, Jan. 2000.

ALTIERI, D.C. Validating survivin as a cancer therapeutic target. **Nat. Rev. Cancer.** v.3, n.1, p.46-54, Jan. 2003.

AMBROSINI, G., ADIDA, C.; ALTIERI, D. C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. **Nat. Med.** v.3, n.8, p.917-21, Aug 1997.

AUERSVALD, L.; ROTHSTEIN, D.; OLIVEIRA, S.C.; *et al.* Indefinite islet allograft survival in mice after a short course of treatment with anti-CD45 monoclonal antibodies. **Transplantation.** v.63, n.9, p.1355-58, May 1997.

AUGSTEIN, P.; ELEFANTY, A.G.; ALLISON, J.; *et al.* Apoptosis and beta-cell destruction in pancreatic islets of NOD mice with spontaneous and cyclophosphamide-accelerated diabetes. **Diabetologia.** v.41, n.11, p.1381-88, Nov. 1998.

BAGLEY, J.; IACOMINI, J. Gene therapy progress and prospects: gene therapy in organ transplantation. **Gene Ther.** V.10, n.8, p.605-11, Apr. 2003.

BALLINGER, W.F.; LACY, P.E. Transplantation of intact pancreatic islets in rats. **Surgery.** V.72, n.2, p.175-82, Aug. 1972.

BARBU, A.R.; AKUSJARVI, G.; WELSH, N. Adenoviral-induced islet cell cytotoxicity is not counteracted by Bcl-2 overexpression. **Mol. Med.** v.8, n.11. p.733-41, Nov. 2002.

BASADONNA, G.P.; AUERSVALD, L.; KHUONG, C.Q.; *et al.* Antibody-mediated targeting of CD45 isoforms: a novel immunotherapeutic strategy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.95, n.7, p.3821-26, Mar. 1998.

BD Adeno-X Virus Purification Kits. **Clontechiques.** v.18, n.3, p.10-11, Jul. 2002.

BELTRAMI, E.; PLESCIA, J.; WILKINSON, J.C.; *et al.* Acute ablation of survivin uncovers p53-dependent mitotic checkpoint functions and control of mitochondrial apoptosis. **J. Biol. Chem.** v.279, n.3, p.2077-84, Jan. 2004.

BENEDICT, S.R. A Reagent for the detection of reducing sugars. **J Biol. Chem.** v.5, p.485-87, 1908.

BERGLUND, O. Different dynamics of insulin secretion in the perfused pancreas of the mouse and rat. **Acta Endocrinol.** v.93, n.1, p.54-60, Jan. 1980.

BERNARD C. *Du suc pancréatique et son rôle dans le phénomènes de la digestion.* **C. R. Soc. Acad. Sci.** (Paris) 1849: 99-119, 1850.

BLANC-BRUDE, O.P.; YU, J.; SIMOSA, H.; *et al.* Inhibitor of apoptosis protein survivin regulates vascular injury. **Nat. Med.** v.8, n.9, p.987-94, Aug. 2002.

BLISS, M. The history of insulin. **Diabetes Care.** V.16, s.3, p.4-7, Dec 1993.

BLOMER, U.; NALDINI, L.; KAFRI, T.; *et al.* Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. **J Virol.** V.71, n.9, p.6641-49, Sep. 1997.

BLUNT, T; FINNIE, N.J.; TACCIOLI, G.E.; *et al.* Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation. **Cell.** v.80, n.5, p.813-23, Mar. 1995.

BLUNT, T.; GELL, D.; FOX, M.; *et al.* Identification of a nonsense mutation in the carboxyl-terminal region of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the *scid* mouse. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.93, n.19, p.10285-90, Sep. 1996.

BONNEVIE-NIELSEN, V.; SKOVGAARD, L. T.; LERNMARK, A. beta-Cell function relative to islet volume and hormone content in the isolated perfused mouse pancreas. **Endocrinology**, v.112, n.3, p.1049-56, Mar. 1983.

BOUCHARDAT, A. *De la glycosurie ou diabète sucre.* Paris, 1875.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** v.7, n.72, p.248-54, May 1976.

BRENDEL, M.D.; HERING B.J.; SCHULTZ, A.O.; *et al.* International Islet Transplant Registry. **Department of Medicine, Justus-Liebig-University of Giessen** 8 (Newsletter 9): 1-20, 2001.

CAMERON, M.J.; ARREAZA, G.A.; WALDHAUSER, L.; *et al.* Immunotherapy of spontaneous type 1 diabetes in nonobese diabetic mice by systemic interleukin-4 treatment employing adenovirus vector-mediated gene transfer. **Gene Ther.** v.7, n.21, p.1840-46, Nov. 2000.

CARLSSON, P.O.; LISS, P.; ANDERSSON, A.; *et al.* Measurement of oxygen tension in native and transplanted rat pancreatic islets. **Diabetes.** v.47, n.7, p.1027-32, Jul. 1998.

CARMELET, P.; JAIN, R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature.** v.407, n.6801, p.249-57, Sep. 2000.

CAWLEY, T. A singular case of diabetes, consisting entirely in the quality of the urine; with an inquiry into the different theories of that disease. **London Med J** v.9, p.286-308, 1788.

CHANTALAT, L.; SKOUFIAS, D.A.; KLEMAN, J.P.; *et al.* Crystal structure of human survivin reveals a bow tie-shaped dimer with two unusual alpha-helical extensions. **Mol. Cell.** v.6, n.1, p.183-89, Jul. 2000.

CHAO, D.T.; LINETTE, G.P.; BOISE, L.H.; *et al.* Bcl-XL and Bcl-2 repress a common pathway of cell death. **J. Exp. Med.** v.182, n.3, p.821-28, Sep. 1995.

CHEN, H.H.; MACK, L.M.; KELLY, R.; *et al.* Persistence in muscle of an adenoviral vector that lacks all viral genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** v.94, n.5, p.1645-50, Mar. 1997.

CHEN, Z.; NAITO, M.; HORI, S.; *et al.* A human-IAP-family gene, apollon, expressed in human brain cancer cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.264, n.3, p.847-54, Nov. 1999.

CHERNAJOVSKY, Y.; GOULD, D.J.; PODHAJCER, O.L. Gene therapy for autoimmune diseases: quo vadis? **Nat. Rev. Immunol.** V.4, n.10, p.800-11, Oct. 2004.

CHOI, K.S.; LEE, T.H.; JUNG, M.H. Ribozyme-mediated cleavage of the human survivin mRNA and inhibition of antiapoptotic function of survivin in MCF-7 cells. **Cancer. Gene Ther.** v.10, n.2, p.87-95, Feb. 2003.

CLAYTON H.A.; LONDON, N.J. Survival and function of islets during culture. **Cell Transplant.** v.5, n.1, p.1-12, Jan-Feb. 1996.

CONTRERAS, J.L.; BILBAO, G.; SMYTH, C.A.; *et al.* Cytoprotection of pancreatic islets before and soon after transplantation by gene transfer of the anti-apoptotic Bcl-2 gene. **Transplantation.** v.71, n.8, p.1015-23, Apr. 2001 (a).

CONTRERAS, J.L.; BILBAO, G.; SMYTH, C.A.; *et al.* Gene transfer of the Bcl-2 gene confers cytoprotection to isolated adult porcine pancreatic islets exposed to xenoreactive antibodies and complement. **Surgery.** v.130, n.2, p.166-74, Aug. 2001(b).

CONTRERAS, J.L.; BILBAO, G.; SMYTH, C.; *et al.* Cytoprotection of pancreatic islets before and early after transplantation using gene therapy. **Kidney Int.** v.61, s.1, p.79-84, Jan. 2002.

CORY, S.; ADAMS, J.M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nat. Rev. Cancer.** v.2, n.9, p.647-56, Sep. 2002.



CUSTER, R.P.; BOSMA, G.C.; BOSMA, M.J. Severe combined immunodeficiency (SCID) in the mouse. Pathology, reconstitution, neoplasms. **Am. J. Pathol.** v.120, n.3, p.464-77, Sep. 1985.

DCCT/EDIC Research Group. Effect of intensive therapy on the microvascular complications of type I diabetes mellitus. **JAMA.** v.287, n.19, p.2563-69, May 2002.

DELANEY, C.A.; PAVLOVIC, D.; HOORENS, A.; *et al.* Cytokines induce deoxyribonucleic acid strands breaks and apoptosis in human pancreatic islet cells. **Endocrinology.** v.138, n.6, p.2610-14, Jun. 1997.

DE MEYER, J. Contribution à l'étude de la pathogénie du diabète pancréatique. **Archive Internationale de Physiologie** 121-180, 1909.

Diabetes in America (2<sup>nd</sup> edition), **NIH Publication** No. 95-1468, 1995.

DOBSON, M. Experiments and observations on the urine in diabetes. In: Medical observations and inquiries by a society of physicians in London, B.d.5, p.298-316, 1776.

DOHI, T.; BELTRAMI, E.; WALL, N.R.; *et al.* Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. **J. Clin. Invest.** v.114, n.8, p.1117-27, Oct. 2004.

DONG, Z.; NISHIYAMA, J.; YI, X.; *et al.* Gene promoter of apoptosis inhibitory protein IAP-2: identification on enhancer elements and activation by severe hypoxia. **Biochem. J.** v.364, s.2, p. 413-21, Jun. 2002.

Effect on intensive diabetes treatment on carotid wall thickness in the epidemiology of diabetes interventions and complications. Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) Research Group. **Diabetes** v.48, p.383-90, 1999.

EFRAT, S.; FEJER, G.; BROWNLEE, M.; *et al.* Prolonged survival of pancreatic islets allografts mediated by adenovirus immunoregulatory transgenes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** v.92, n.15, p.6947-51, Jul. 1995.

EIZIRIK, D.L.; SANDLER, S.; WELSH, N.; *et al.* Cytokines suppress human islet function irrespective of their effects on nitric oxide generation. **J. Clin. Invest.** v.93, n.5, p.1968-74, May 1994.

EPSTEIN, A.A. An accurate microchemical method of estimating sugar in the blood. **JAMA.** v.63, p.1667-68, 1914.

EYKHOLT, R.; MITCHELL, M.D.; MARVIN K. W. Accelerated Titering of Adenoviruses. **Biotechniques.** v.28, p.871-73, 2000.

FAHMY, R.G.; DASS, C.R.; SUN, L.Q.; *et al.* Transcription factor Egr-1 supports FGF-dependent angiogenesis during neovascularization and tumor growth. **Nat. Med.** v.9, n.8, p.1026-32., Aug. 2003.

FECTEAU, S.; BASADONNA, G.P.; FREITAS, A.; *et al.* CTLA-4 up-regulation plays a role in tolerance mediated by CD45. **Nat. Immunol.** v.2, n., p.58-63, Jan. 2001.

FEDERICI, M.; HRIBAL, M.; PEREGO, L.; *et al.* High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of Langerhans: A potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death program. **Diabetes** v.50, n.6, p.1290-1301, Jun. 2001.

FENG, S.; QUICKEL, R.R.; HOLLISTER-LOCK, J.; *et al.* Prolonged xenograft survival of islets infected with small doses of adenovirus expressing CTLA4Ig. **Transplantation.** v.67, n.12, p.1607-13, Jun. 1999.

FESTING, M.F.W. Inbred strains of mice. Mouse Genome Informatics, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine. Disponível em: <<http://www.informatics.jax.org>>. Acesso em 15 set 2005.

FIORETTO, P.; STEFFES, M.W.; SUTHERLAND, D.E.R. Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. **N. Engl. J. Med.** v.339, n.2, p.69-75, Jul. 1998.

FISHER, K.J.; JOOSS, K.; ALSTON, J.; *et al.* Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene therapy. **Nat. Med.** v.3, n.3, p.306-12, Mar 1997.

FOLIN, O.; WU, H. A system of blood analysis. **J. Biol. Chem.** v.38, p.81-110, 1919.

FRENCH, M.B.; ALLISON, J.; CRAM, D.S.; *et al.* Transgenic expression of mouse proinsulin II prevents diabetes in nonobese diabetic mice. **Diabetes.** v.46, n.1, p.34-9, Jan. 1997.

GAINER, A.L.; KORBUTT, G.S.; RAJOTTE, R.V.; *et al.* Expression of CTLA4-Ig by biolistically transfected mouse islets promotes islet allograft survival. **Transplantation.** v.63, n.7, p.1017-21, Apr. 1997.

GARCIA, M.C.; HERMANS, M.P.; HENQUIN, J.C. Glucose-, calcium-, and concentration- dependence of acetylcholine stimulation of insulin release and ionic fluxes in mouse islets. **Biochem. J.** v.254, n.1, p.211-18, Aug. 1988.

GARRATT, K.N.; BRADY, P.A.; HASSINGER, N.L.; *et al.* Sulfonylurea drugs increase early mortality in patients with diabetes mellitus after direct angioplasty for acute myocardial infarction. **J. Am. Coll. Cardiol.** v.33, n.1, p.1560-69, Jan. 1999.

GIANNOUKAKIS, N.; RUDERT, W.A.; ROBBINS, P.D.; *et al.* Targeting autoimmune diabetes with gene therapy. **Diabetes**. v.48, n.11, p.2107-21, Nov. 1999.

GILON, P.; HENQUIN, J-C. Mechanisms and physiologic significance of the cholinergic control of pancreatic b-cell function. **Endocr. Rev.** v.22, n.5, p.565-604, Oct. 2001.

GOEDDE, M.F.; GRIMBERGEN, J.M.; TOET, K.H.; *et al.* Adenovirus-mediated transfer of the 39 kD receptor-associated protein increases fibrinolytic capacity. **Kidney Int.** v.60, n.1, p.117-25, Jul. 2001.

GRAHAM, F. L. & PREVEC, L. Manipulation of adenovirus vectors. In **Methods Mol. Biol.** Vol 7: Gene Transfer and Expressions Protocols. Ed. Murray, EJ (Human Press Inc., Clifton, NJ), p.109-128, 1991.

GRAHAM, F.L.; SMILEY, J.; RUSSEL, W.C.; *et al.* Characterization of human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. **J. Gen. Virol.** v.36, n.1, p.59-72, Jul. 1977.

GROSSMAN, D.; KIM, P.J.; BLANC-BRUDE, O.P.; *et al.* Transgenic expression of survivin in keratinocytes counteracts UVB-induced apoptosis and cooperates with loss of p53. **J. Clin. Invest.** v.108, n.7, p.991-9, Oct. 2000.

GUILLOT, C.; LE MAUFF, B.; CUTURI, M.C.; *et al.* Gene therapy in transplantation in the year 2000: moving towards clinical applications? **Gene. Ther.** v.7, n.1, p.14-9, Jan. 2000.

HABEL, R. E.; FREWEIN, J.; SACK, W.O., *et al.* Nomina Anatomica Veterinaria. Zurich: World Association of Veterinary Anatomists, 1994.

HARLAN, D.M. Gene-altered islets for transplant: giant leap or small step? **Endocrinology**. v.145, n.2, p.463-66, Feb. 2004.

HERING B.J.; RICORDI, C. Islet transplantation for patients with type I diabetes: results, research priorities and reasons for optimism. **Graft**. v.2, p.12-27, 1999.

HOGANSON, D. K; MA, J. C.; ASATO, L.; *et al.* Development of a stable adenoviral vector formulation. Disponível em:<<http://www.bioprocessingjournal.com>>, p.43-48. Acesso em: 12 de março de 2005.

HOLCIK, M.; GIBSON, H.; KORNEŁUK, R.G. XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. **Apoptosis**. v.6, n.4, p.253-61, Aug. 2001.

HOSOKAWA, M; HAMA, S; MANDAI, K; *et al.* Preparation of purified, sterilized, and stable adenovirus vectors using albumin. **J. Virol. Methods**. v.103, n.2, p.191-9, May 2002.

HUTCHINS, B. Development of a reference material for characterizing adenovirus vectors. Disponível em: <[www.bioprocessingjournal.com](http://www.bioprocessingjournal.com)> , p.25-28,. Acesso em: 12 de março de 2005.

ISLAM, A.; KAGEYAMA, H.; TAKADA, N.; *et al.* High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. **Oncogene** v.19, p.617-23, 2000.

IWAHASHI, H.; HANFUSA, T.; EGUCHI, Y.; *et al.* Cytokine-induced apoptotic cell death in a mouse pancreatic beta-cell line: inhibition by Bcl-2. **Diabetologia** v.39, n.5, p.530-36, May 1996.

JAHR, H.; HERING B.; FEDERLIN, K.; *et al.* Activation of human complement by collagenase and ficoll. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.** v.103, s.2, p.27-9, 1995.

JANSSON, L.; SANDLER, S. Influence of hyperglycemia on blood perfusion of autotransplanted pancreatic islets in diabetic rats. **Diabetes.** v.38, s.1, p.196-8, Jan. 1989.

JIN, Y.Z.; XIE, S.S. Bicistronic adenovirus-mediated gene transfer of CTLA4Ig gene and CD40Ig gene result in indefinite survival of islet xenograft. **Transplant. Proc.** v.35, n.8, p.3165-66, Dec. 2003.

KANWAR, J.R.; SHEN, W.P.; KANWAR, R.K.; *et al.* Effects of survivin antagonists on growth of established tumors and B7-1 immunogene therapy. **J. Natl. Cancer Inst.** v.93, n.20, p.1541-52, Oct. 2001.

KASOF, J.F.; GOMES, B.C. Livin, a novel inhibitor-of-apoptosis (IAP) family member. **J. Biol. Chem.** v.276, n.5, p.3238-46, Feb. 2001.

KATZ, L.M.; LOTOCKI, G.; WANG, Y.; *et al.* Regulation of caspases and XIAP in the brain after asphyxial cardiac arrest in rats. **Neuroreport.** v.12, n.17, p.3751-54, Dec. 2001.

KAUFMAN, D.B.; BAKER, M.S.; CHEN, X.; *et al.* Sequential kidney/islet transplantation using prednisone-free immunosuppression. **Am. J. Transplant.** v.2, n.7, p.674-7, Aug. 2002.

KEANE, R.W.; KRAYDIEH, S.; LOTOCKI, G.; *et al.* Apoptotic and antiapoptotic mechanisms after traumatic brain injury. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** v.21, n.10, p.1189-98, Oct. 2001(a).

KEANE, R.W.; KRAYDIEH, S.; LOTOCKI, G.; *et al.* Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** v.60, n.5, p.422-9, May 2001(b).

KEARNS-JONKER, M.; FISHER-LOUGHEED, J.; SHULKIN, I.; *et al.* Use of lentiviral vectors to induce long-term tolerance to gal(+) heart grafts. **Transplantation**. v.77, n.11, p.1748-54, Jun. 2004.

KENNEDY, W.R.; NAVARRO, X.; GOETZ, F.C. Effects of pancreatic transplantation on diabetic neuropathy. **N. Engl. J. Med.** v.322, n.15, p.1031-7, Apr. 1990.

KING, C.; DAVIES, J.; MUELLER, R.; *et al.* TGF-beta 1 alters APC preference, polarizing islet antigen responses toward a Th2 phenotype. **Immunity**. v.8, n.5, p.601-13, May 1998.

KOBAYASHI, K.; HATANO, M.; OTAKI, M.; *et al.* Expression of a murine homologue of the inhibitor of apoptosis protein is related to cell proliferation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v.96, n.4, p.1457-62, Feb. 1999.

KREUWEL, H.T.; SHERMAN, L.A. The role of Fas-FasL in CD8+T-cell mediated insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). **J. Clin. Immunol.** v.21, n.1, p.15-8, Jan. 2001.

LACY, P.E.; KOSTIANOVSKY, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. **Diabetes** v.16, n.1, p.35-9, Jan. 1967.

LAGUESSE, E. *Structure et développement du pancreas d'après les travaux récents*. **J. Anat.** (Paris) 30: 591-608, 1894.

LALLY, F.J.; RATCLIFF, H.; BONE, A.J. Apoptosis and disease progression in the spontaneously diabetic BB/S rat. **Diabetologia** v.44, n.3, p.320-4, Apr. 2001.

LANCEREAUX, E. *Le diabète maigre: ses symptômes, son évolution, son pronostic et son traitement; ses rapports avec les alterations du pancréas*. **Union Med** (Paris) v.29, p.161-8, 1880.

LEIBOWITZ, G.; BEATTIE, G.M.; KAFRI, T.; *et al.* Gene transfer to human pancreatic endocrine cells using viral vectors. **Diabetes**. v.48, n.4, p.745-53, Apr. 1999.

LEITER, E.H. The NOD mouse: a model for insulin-dependent diabetes mellitus. **Curr. Protocols Immunol.** v.24, s.15.9.1-15.9.23, 1997.

LENZEN, S. Insulin secretion by isolated perfused rat and mouse pancreas. **Am. J. Physiol.** v.236, n.4, p.E391-E400, Apr. 1979.

LEVINE, R.; KRALL, L.; BARNETT, D. The history of diabetes. In KHAN, C.R; WEIR, G.C, eds. *Joslin's diabetes mellitus*, 13<sup>th</sup> edition, Philadelphia: Lea & Febiger, 1-14, 1994.

LI, F.; ACKERMANN, E.J.; BENNETT, C.F.; *et al.* Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. **Nat. Cell Biol.** v.1, n.8, p.461-6, Dec. 1999.

LI, F.; AMBROSINI, G.; CHU, E.Y.; *et al.* Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. **Nature.** v.396, n.6711, p.580-4, Dec. 1998.

LI, F.; ALTIERI, D.C. The cancer antiapoptosis mouse survivin gene: characterization of locus and transcriptional requirements of basal and cell cycle-dependent expression. **Cancer Res.** v.59, n.13, p.3143-51, Jul. 1999.

LIU, Y.; RABINOVITCH, A.; SUAREZ-PINZON, W.; *et al.* Expression of the Bcl-2 gene from a defective HSV-1 amplicon vector protects pancreatic beta-cells from apoptosis. **Hum. Gene Ther.** v.7, n.14, p.1719-26, Sep. 1996.

LONDON, N.J.; ROBERTSON, G.S.; CHADWICK, D.R.; *et al.* Human pancreatic islet isolation and transplantation. **Clin. Transplant.** v.8, n.5, p.421-59, Oct. 1994.

LOTOCKI, G.; KEANE, R.W. Inhibitors of Apoptosis Proteins in Injury and Disease. **Life.** v.54, n.5, p.231-40, Nov. 2002.

MA, Y.H.; WANG, J.; RODD, G.G.; *et al.* Differences in insulin secretion between rat and mouse islets: role of cAMP. **Eur. J. Endocrinol.** v.132, n.3, p.370-6, Mar. 1995.

MACLEAN, R.A.; SANDERS, W.L.; STROUP, W.W. A unified approach to mixed linear models. **Am. Stat.** v.45, p.54-64, 1991.

MAEDLER, K.; SERGEEV, P.; RIS, F.; *et al.* Glucose-induced beta cell production of IL-1 $\beta$  contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. **J. Clin. Invest.** v.110, n.6, p.851-60, Sep. 2002.

MAHOTKA, C.; LIEBMANN, J.; WENZEL, M.; *et al.* Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants. **Cell. Death Differ.** v.9, n.12, p.1334-42, Dec. 2002.

MAHOTKA, C.; WENZEL, M.; SPRINGER, E.; *et al.* Survivin-deltaEx3 and survivin -2B: Two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. **Cancer Res.** v.59, n.24, p.6097-102, Dec. 1999.

MARKMANN, J.F.; DENG, S.; DASAI, S.; *et al.* The use of non-heart beating donors for isolated pancreatic islet transplantation. **Transplantation** v.75, n.9, p.1423-9, May 1999.

MELO, L.G.; PACHORI, A.S.; KONG, D.; *et al.* Gene and cell-based therapies for heart disease. **FASEB J.** v.18, n.6, p.648-63, Apr. 2004.

MINKOWSKI, O. Historical development of the theory of pancreatic diabetes. **Diabetes** v.38, p.1-6, 1889.

MOON, C.; OH, Y.; ROTH, J.A. Current status of gene therapy for lung cancer and head and neck cancer. **Clin. Cancer Res.** v.9, n.14, p.5055-67, Nov. 2003.

MOREL, P.; GOETZ, F.C.; MOUDRY-MUNNS, K. Long-term glucose control in patients with pancreatic transplants. **Ann. Intern. Med.** v.115, n.9, p.694-9, Nov. 1991.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods.** v.65, n.1-2, p.55-63, Dec. 1983.

MUCHMORE, S.W.; CHEN, J.; JAKOB, C.; *et al.* Crystal structure and mutagenic analysis of the inhibitor-of-apoptosis protein survivin. **Mol. Cell.** v.6, n.1, p.173-82, Jul. 2000.

NAGAHAMA, M.; SHIRAISHI, M.; OSHIRO, T.; *et al.* Adenovirus-mediated gene transfer of triple human complement regulating proteins (DAF, MCP and CD59) in the xenogeneic porcine-to-human transplantation model. **Transpl. Int.** v.15, n.2, p.205-11, May 2002.

NALDINI, L.; BLOMER, U.L.; GALLAY, P.; *et al.* In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. **Science** v.272, n.5259, p.263-7, Apr. 1996.

NAKAYAMA, K.; FREW, I.J.; HAGENSEN, M.; *et al.* Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1 alpha abundance, and modulates physiological responses to hypoxia. **Cell.** v.117, n.7, p.851-3, Jun. 2004.

O'CONNOR, D.S.; SCHECHNER, J.S.; ADIDA, C.; *et al.* Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells. **Am. J. Pathol.** v.156, n.2, p.393-8, Feb.2000 (a).

O'CONNOR, D.S.; GROSSMAN, D.; PLESCIA, J.; *et al.* Regulation of apoptosis at cell division by p34<sup>cdc2</sup> phosphorylation of survivin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.97, n.24, p.13103-7, Nov. 2000 (b).

OJO, A.O.; MEIER-KRIESCHE, H.U.; HANSON, J.A.; *et al.* Impact of simultaneous pancreas-kidney transplantation on long-term patient survival. **Transplantation** v.71, n.1, p.82-90, Jan. 2001.

OKADA, H.; BAKAL, C.; SHAHINIAN, A.; *et al.* Survivin loss in thymocytes triggers p53-mediated growth arrest and p53-independent cell death. **J. Exp. Med.** v.199, n.3: 399-410, Feb. 2004.

OLIE, R.A.; SIMOES-WUST, A.P.; BAUMANN, B.; *et al.* A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. **Cancer Res.** v.60, n.11, p.2805-9, Jun. 2000.

OLTVAI, Z.N.; KORSMEYER, S.J. Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. **Cell** v.79, n.2, p.189-92, Oct. 1994.

OPIE, E.L. The relation of diabetes mellitus to lesions of the pancreas: hyaline degeneration of the islands of Langerhans. **J. Exp. Med.** v.5, p.527-40, 1900.

PANIJAYANOND, P; SOROFF, H.S; MONACO, A.P. Pancreatic islet isografts in mice. **Surg. Forum.** v.24, p.329-30, 1973.

PARASKEVAS, S.; DUGUID, W.P.; MAYSINGER, D.; *et al.* Apoptosis occurs in freshly isolated human islets under standard culture conditions. **Transplant. Proc.** v.29, n.(1-2), p.750-2, Feb-Mar. 1997.

PARASKEVAS, S.; MAYSINGER, D.; WANG, R.; *et al.* Cell loss in isolated human islets occurs by apoptosis. **Pancreas** v.20, n.3, p.270-6, Apr. 2000.

PAULESCO, N.C. Action de l'extrait pancréatique injecté dans le sang, chez un animal diabétique. **C. R. Soc. Biol.** v.85, p.555-9, 1921.

PERRELET, D.; FERRI, A.; MACKENZIE, A.E.; *et al.* IAP family proteins delay motor neuron cell death in vivo. **Eur. J. Neurosci.** v.12, n.6, p.2059-67, Jun. 2000.

PERSONS, D.A.; TISDALE, J.F. Gene therapy for the hemoglobin disorders. **Semin Hematol.** v.41, n.4, p279-86, Oct. 2004.

PORTER, R. The greatest benefit to mankind, a medical history of humanity. New York: **WW NORTON**, p.71, 1997.

PORTUESE, E.; ORCHARD, T. Mortality in Insulin-Dependent Diabetes. In: HARRIS, M.I.; COWIE, C.C.; STERN, M.P; BOYKO, E.J.; REIBER, G.E.; BENNET, P.H. (eds) **Diabetes in America**. US Govt Printing Office, Washington, DC, p.221-232, 1995.

PRICE, J.; TURNER, D.; CEPKO, C. Lineage analysis in the vertebrate nervous system by retrovirus-mediated gene transfer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.84, n.1, p.156-60, Jan. 1987

Principles for utilization and care of vertebrate animals used in testing research and training. **Code of Federal Regulations of US Government**, v.9, n1, Parts 1-199, 2000.

PRUD'HOMME, G.J.; CHANG, Y. Prevention of autoimmune diabetes by intramuscular gene therapy with a nonviral vector encoding an interferon-gamma receptor/IgG1 fusion protein. **Gene Ther.** v.6, n.5, p.771-7, May 1999.

RABINOVITCH, A.; SUAREZ-PINZON, W.L.; SORENSEN, O.; *et al.* Combined therapy with interleukin-4 and interleukin-10 inhibits autoimmune diabetes recurrence



in syngeneic islet-transplanted nonobese diabetic mice. Analysis of cytokine mRNA expression in the graft. **Transplantation**. v.60, n.4, p.368-74, Aug. 1995.

RABINOVITCH, A.; SUAREZ-PINZON, W.; STRYNADKA, K.; *et al.* Transfection of human pancreatic islets with an anti-apoptotic gene (bcl-2) protects beta-cells from cytokine-induced destruction. **Diabetes**. v.48, n.6, p.1223-9, Jun. 1999.

RAMSAY, R.C.; GOETZ, F.C.; SUTHERLAND, D.E.R.; *et al.* Progression of diabetic retinopathy after pancreas transplantation for insulin-dependent diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.** v.318, n.4, p.208-14, Jan. 1988.

RECKARD, C.R.; ZIEGLER, M.M.; BARKER, C.F. Physiological and immunological consequences of transplanting isolated pancreatic islets. **Surgery** v.74, n.1, p.91-9, Jul. 1973.

REGISTRO BRASILEIRO DE TRANSPLANTES. 2004;10(2):12-13. Disponível em: <<http://www.abto.org.br>>.

RICORDI, C.; LACY, P.E.; FINKE, E.H.; *et al.* Automated method for isolation of human pancreatic islets. **Diabetes**. v.37, n.4, p.413-20, Apr. 1988.

RICORDI, C.; STROM, T.B. Clinical islet transplantation: advances and immunological challenges. **Nat. Rev. Immunol.** v.4, n.4, p.259-68, Apr. 2004.

ROBERTSON, R.P. Islet transplantation as a treatment for diabetes - a work in progress. **N. Engl. J. Med.** v.350, n.7, p.694-705, Feb. 2004.

ROLLO, J. An account of two cases of the diabetes mellitus, with remarks as they arose during the progress of the cure. London: **Dilly**, 1797.

ROTHER, K.I.; HARLAN, D.M. Challenges facing islet transplantation for the treatment of type 1 diabetes mellitus. **J. Clin. Invest.** v.114, n.7, p.877-83, Oct. 2004.

RYAN, E.A.; LAKEY, J.R.; PATY, B.W.; *et al.* Successful islet transplantation: continued insulin reserve provides long-term glycemic control. **Diabetes**. v.51, n.7: 2148-57, Jul. 2002.

RYAN, E.A.; LAKEY, J.R.; RAJOTTE, R.V.; *et al.* Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. **Diabetes**. v.50, n.4, p.710-9, Apr. 2001.

SALDEEN, J.; CURIEL, D.T.; EIZIRIK, D.L.; *et al.* Efficient gene transfer to dispersed human pancreatic cells in vitro using adenovirus-polysine/DNA complexes or polycationic liposomes. **Diabetes**. v.45, n.9, p.1197-1203, Sep. 1996.

SALVALAGGIO, P.R.O. DENG, S.; ARIYAN, C.E.; *et al.* Islet filtration: A simple and rapid new purification procedure that avoids Ficoll and improves islet mass. **Transplantation**. v.74, n.6, p.877-9, Sep. 2002.

SALVESEN, G.S.; DUCKETT, C.S. IAP proteins: blocking the road to death's door. **Nat. Mol. Cell Biol.** v.3, n.6, p.401-10, Jun. 2002.

SANDLER, S.; JANSSON, L. Blood flow measurements in autotransplanted pancreatic islets of the rat: impairment of the blood perfusion of the graft during hyperglycemia. **J. Clin. Invest.** v.80, n.1, p.17-21, Jul. 1987.

SARMA, V.; LIN, Z.; CLARK, L.; *et al.* Activation of the B-cell surface receptor CD40 induces A20, a novel zinc finger that inhibits apoptosis. **J. Biol. Chem.** v.270, n.21, p.12343-6, May 1995.

SCHARP, D.W.; LACY, P.E.; SANTIAGO, J.V.; *et al.* Insulin independence after islet transplantation into type I diabetic patient. **Diabetes.** v.39, n.4, p.515-8, Apr. 1990.

SCHWINGSHACKL, A.; BLASKO, I.; STEINER, E.; *et al.* Sex steroids do not prevent amylin-induced apoptosis in human cells. **Exp. Cell Res.** v.241, n.1, p.265-8, May 1998.

SERREZE, D.V.; CHAPMAN, H.D.; VARNUM, D.S.; *et al.* Initiation of autoimmune diabetes in NOD/Lt mice is MHC class I-dependent. **J. Immunol.** v.158, n.8, p.3978-86, Apr. 1997.

SHADEWALDT, H. The history of diabetes mellitus. In: VAN ENGELHARDT, D., ed. Diabetes, its medical and cultural history. Berlin: Springer Verlag, p.43-100, 1987.

SHAFRIR E. History and perspective of diabetes illustrated by postage stamps. **Freund Publishing House Ltd**, [Reprinted by Joslin Diabetes Center, Publication Dept. Boston, MA. March 2001], 1999.

SHANKAR, S.L.; MANI, S.; O'GUIN, K.N.; *et al.* Survivin inhibition induces human neural tumor cell death through caspase-independent and -dependent pathways. **J. Neurochem.** v.79, n.2, p.426-436, Oct. 2001.

SHAPIRO, A.M.J.; LAKEY, J.R.; RYAN, E.A.; *et al.* Islet transplantation in seven patients with type I diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. **N. Engl. J. Med.** v.343, n.4, p.230-8, Jul. 2000.

SHAPIRO, A.M.J.; RYAN, E.A.; PATY, B.; *et al.* Human islet transplantation can correct diabetes. **Transplantation.** v.74, s.4, p.119, 2002.

SHIMABUKURO, M.; ZHOU, Y.Y.; LEVI, M.; *et al.* Fatty acid-induced beta-cell apoptosis. A link between obesity and diabetes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.95, n.5, p.2498-502, Mar. 1998.

SIMONS, M.; BEINROTH, S.; GLEICHMAN, M.; *et al.* Adenovirus-mediated gene transfer of inhibitors of apoptosis protein delays apoptosis in cerebellar granule neurons. **J. Neurochem.** v.72, n.1, p.292-301, Jan. 1999.

SJOHOLM, A. Aspects of the involvement of interleukin-1 and nitric oxide in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. **Cell Death Differ.** v.5, n.6, p.461-8, Jun. 1998.

SONG, Z.; YAO, X.; WU, M. Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the antiapoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. **J. Biol. Chem.** v.278, n.25, p.23130-40, Jun. 2003.

STARLING, E.H. The Croonian Lectures on the chemical correlation of the functions of the body. **Lancet** 2: 339-341, 423-425, 501-503, 579-583, 1905.

STENNICKE, H.R.; RYAN, C.A.; SALVESEN, G.S. Reprieve from execution: the molecular basis of caspase inhibition. **Trends Biochem. Sci.** v.27, n.2, p.94-101, Feb. 2002.

STEURER, W.; NICKERSON, P.W.; STEELE, A.W.; *et al.* Ex vivo coating of islet cell allografts with murine CTLA4/Fc promotes graft tolerance. **J. Immunol.** v.155, n.3, p.1165-74, Aug. 1995.

SUTHERLAND, D.E.R. Pancreas and islet transplantation. I Experimental studies. **Diabetologia.** v.20, n.3, p.161-85, Mar. 1981.

SUTHERLAND, D.E.R. Pancreas and islet cell transplantation: now and then. **Transplant. Proc.** v.28, n.4, p.2131-3, Aug. 1996.

SUTHERLAND, D.E.R.; MATAS, A.J.; NAJARIAN, J. Pancreatic islet transplantation. **Surg. Clin. N. Ame.** v. 58, n. 2, p. 365-390, Apr. 1978.

The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.** v.329, n.14, p.977-86, Sep. 1993.

THOMAS, C.E.; EHRHARDT, A.; KAY, M.A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. **Nat. Rev. Genet.** v.4, n.5, p.346-58, May 2003.

THOMAS, D.; YANG H.; BOFFA, D.J.; *et al.* Proapoptotic BAX is hyperexpressed in isolated human islets compared with anti-apoptotic BCL-2. **Transplantation.** v.74, n.11, p.1489-96, Dec. 2002.

THOMAS, F. T.; CONTRERAS, J. L.; BILBAO, G.; *et al.* Anoikis, extracellular matrix, and apoptosis factors in isolated islet cell transplantation. **Surgery.** v.126, n.2, p.299-304, Aug. 1999.

THOMAS, F. T.; WU, J.; CONTRERAS, J.L.; *et al.* A tripartite anoikis-like mechanism causes early isolated islet apoptosis. **Surgery**. v.130, n.2, p.333-8, Aug. 2001.

TRAN, J.; RAK, J.; SHEEHAN, C.; *et al.* Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins Survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.264, n.3, p.781-8, Nov. 1999.

TRINCAVELLI, M.L.; MARSELLI, L.; FALLENI, A.; *et al.* Upregulation of mitochondrial peripheral benzodiazepine receptor expression by cytokine-induced damage of human pancreatic islets. **J. Biol. Chem.** v.84, n.3, p.636-44, 2002.

UNIVERSITY OF MINNESOTA. International Pancreas Transplant Registry (IPTR). Disponível em: <<http://www.iptr.umn.edu>> Acesso em 15 set. 2005.

VERHAGEN, A.M.; COULSON, E.J.; VAUX, D.L. Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPS and other BIRPs. **Genome Biol.** v.2, n.7, p.3009.1-3009.10, Jul. 2001.

VON MERING, J.; MINKOWSKI, O. *Diabetes Mellitus nach Pankreasextirpation*. **Zentralbl Klin Med** 10: 393-394, 1889.

WARNOCK, G.L.; KNETEMAN, N.M.; RYAN, E.A.; *et al.* Long-term follow-up after transplantation of insulin-producing pancreatic islets into patients with type I (insulin dependent) diabetes mellitus. **Diabetologia** v.35, n.1, p.89-95, Jan. 1992.

WILLIAMS, N.S.; GAYNOR, R.B.; SCOGGIN, S.; *et al.* Identification and validation of genes involved in the pathogenesis of colorectal cancer using cDNA microarrays and RNA interference. **Clin. Cancer Res.** v.9, n.3, p.931-46, Mar. 2003.

WILLIS, T. *Pharmaceutica rationalis sive diatribe de medicamentorum operationibus in humano corpore*. 2 vols. London, 1674-1675.

WHITE, S.A.; ROBERTSON, G.S.; LONDON, N.J.; *et al.* Human islet autotransplantation to prevent diabetes after pancreas resection. **Dig. Surg.** v.17, n.5, p.439-50, 2000.

XIA, C.; XU, Z.; YUAN, X.; *et al.* Induction of apoptosis in mesothelioma cells by antisurvivin oligonucleotides. **Mol. Cancer. Ther.** v.1, n.9, p.687-94, Jul. 2002.

XU, D.; BUREAU, Y.; McINTYRE, D.C.; *et al.* Attenuation of ischemia-induced cellular and behavioral deficits by X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein overexpression in the rat hippocampus. **J. Neurosci.** v.19, n.12, p.5026-33, Jun. 1999.

YAGIHASHI, S. Pathology of diabetes mellitus. **Nippon Naika Gakkai Zasshi** v.85, n.4, p.568-72, Apr. 1996.

YANG, Z.; CHEN, M.; WU, R.; *et al.* Suppression of autoimmune diabetes by viral IL-10 gene transfer. **J. Immunol.** v.168, n.12, p.6479-85, Jun. 2002.

YASUDA, H.; NAGATA, M.; ARISAWA, K. *et al.* Local expression of immunoregulatory IL-12p40 gene prolonged syngeneic islet graft survival in diabetic NOD mice. **J. Clin. Invest.** v.102, n.10, p.1807-14, Nov. 1998.

YIN, X.M.; OLTVAI, Z.N.; KORSMEYER, S.J. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with BAX. **Nature** v.369, n.6478, p.321-3, May 1994.

YOUNOSZAI, R.; SORENSON, R.L.; LINDALL, A.W. Homotransplantation of isolated pancreatic islets. **Diabetes.** v.19, s. 406, 1970.

ZAWALICH, W.S.; ZAWALICH, K.C. Regulation of insulin secretion by phospholipase C. **Am. J. Physiol.** v.271, n3, p.E409-16, Sep. 1996.

ZAWALICH, W.S.; ZAWALICH, K.C.; KELLEY, G.G. *et al.* Regulation of insulin release by phospholipase C activation in mouse islets: differential diagnosis of glucose and neurohumoral stimulation. **Endocrinology.** v.136, n.11, p.4903-9, Nov. 1995.

ZECKZER, D.; WONG, F.S.; WEN, L.; *et al.* Inhibition of diabetes by an insulin-reactive CD4-T cell clone in the nonobese diabetic mouse. **Diabetes.** v.46, n.7, p.1124-32, Jul. 1997.

ZEHRER, C.L.; GROSS, C.R. Quality of life in pancreas transplant recipients. **Diabetologia.** v.34, s.1, p.145-9, Aug. 1991.

ZHOU, Y.P.; PENA, J.C.; ROE, M.W.; *et al.* Overexpression of Bclx(L) in beta-cells prevents cell death but impairs mitochondrial signal for insulin secretion. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** v.278, n.2, p.340-51, Feb. 2000.

## ANEXO

### ANEXO 1- SOLUÇÕES

1. Solução tampão de lise por hipóxia:
  - Tris 20  $\mu$ M pH-7.2
  - DOC 0,5%
  - Triton 1%
  - SDS 0,1%
  - NaCl 150  $\mu$ M
  - EDTA 1mM
  - Inibidor de Proteinase 25X
  
2. Solução tampão para Western blot:
  - M Tris-Cl 0.225 pH-6.8
  - Glicerol 50%
  - SDS 5%
  - Azul Bromofenol 0.05%
  - Dithiothreitol (DTT) 0.25 M
  
3. Solução Tampão de Krebs-bicarbonato:
  - NaCl 115mmol/l
  - KCl 5 mmol/l
  - $\text{CaCl}_2$  2.2 mmol/l
  - $\text{MgCl}_2$  1mmol/l
  - $\text{NaHCO}_3$  mmol/l
  - ABS 170mg/dl

**ANEXO 2 - TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE INTRA-PERITONEAL EM CAMUNDONGOS NOD/SCID**

Tempo (min.)	Surv.1	Surv.2	Controle.1	Controle.2
0	76	116	99	126
15	147	235	279	280
30	112	126	297	276
45	103	127	194	158
60	89	117	155	125
90	86	118	94	116
120	90	107	102	101

\* valores glicêmicos em mg/dl. Tempo 0 min. Injeção intraperitoneal de 2g/kg de peso dextrose.

### ANEXO 3 - GLICEMIA DOS RECEPTORES DE ENXERTO MARGINAL SINGÊNICO DE ILHOTAS

D	GFP1	GFP2	GFP3	GFP4	GFP5	GFP6	GFP7	GFP8	GFP9	GFP10
0	420	482	495	457	456	372	500	372	372	500
1	401	569	480	312	456	276	578	303	303	515
5	326	502	477	402	439	276	509	323	325	440
10	405	453	411	429	501	320	454	436	436	400
20	431	511	466	452	389	401	428	397	397	403
30	367	452	439	580	403	278	327	383	383	454
40	367	445	409	580	376	276	338	207	273	382
50	362	457	314	430	385	376	327	329	329	340
60			355				400			
D	Surv.1	Surv.2	Surv.3	Surv.4	Surv.5	Surv.6	Surv.7	Surv.8	Surv.9	Surv.10
0	443	383	498	407	340	360	407	550	510	510
1	443	365	377	205	274	275	205	330	431	431
5	205	420	376	130	274	285	128	247	437	437
10	198	452	338	139	340	307	139	143	376	376
20	165	431	381	148	410	354	138	150	346	346
30	143	237	204	148	307	180	148	170	367	367
40	143	272	167	169	316	201	169	129	298	261
50	140	204	161	162	346	210	162	133	225	221
60	225	304	295	325			343	232		

D-dias pós-transplante; 60 dias- 5 dias após nefrectomia do rim esquerdo contendo o enxerto de ilhotas.



**ANEXO 4 - SOBREVIDA DE ENXERTOS DE ILHOTAS ALOGÊNICOS EM RECEPTORES C57BL/6**

Tratamento do Enxerto de Ilhotas	Sobrevida do Enxerto (dias)	n	M
Controles sem tratamento	9,10,10,11,12,14,15,16	8	>10
Transdução com pAd-GFP	12,13,13,13,14,14,16	7	13
Transdução com pAd-survivina	12,14,18,20,20,20,20,21,24,26	10	20 *

n-número de animais em cada grupo; M-mediana.